



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 362 675**

51 Int. Cl.:

C12N 9/96 (2006.01)

A61K 39/39 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **06764894 .9**

96 Fecha de presentación : **03.07.2006**

97 Número de publicación de la solicitud: **1899462**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **19.03.2008**

54 Título: **Sistemas acuosos estables que comprenden proteínas.**

30 Prioridad: **02.07.2005 GB 0513653**
22.05.2006 GB 0610140

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
11.07.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
11.07.2011

73 Titular/es: **ARECOR LIMITED**
2 Cambridge Science Park
Cambridge CB4 0FE, GB

72 Inventor/es: **Jezek, Jan**

74 Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 362 675 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Sistemas acuosos estables que comprenden proteínas

Campo de la invención

5

Esta invención se refiere a sistemas acuosos estables que comprenden proteínas.

Antecedentes de la invención

10

La pérdida de la estructura terciaria natural de una proteína está asociada generalmente a la pérdida de su actividad biológica. Por tanto, es fundamental asegurar que una proteína activa (por ejemplo, una vacuna, proteína terapéutica, proteína diagnóstica, etc.) se conserve en condiciones en las que se mantenga la estructura terciaria natural.

15

La conservación de proteínas durante cualquier periodo de tiempo plantea problemas de estabilidad. Las fluctuaciones de la estructura son proporcionales a la temperatura. Las proteínas son, por lo tanto, generalmente más estables a temperaturas inferiores. Típicamente, las proteínas han de guardarse liofilizadas o congeladas (aproximadamente a -20°C), para conservar su actividad biológica. Si se conserva liofilizada o congelada, la proteína ha de reconstituirse antes de su uso. Para una conservación de las proteínas durante un breve periodo, puede ser suficiente una refrigeración a 4°C.

20

Las proteínas son macromoléculas que consisten en secuencias de 20 aminoácidos diferentes presentes en la naturaleza. Siete de estos aminoácidos (ácido aspártico, ácido glutámico, histidina, cisteína, tirosina, lisina y arginina) contienen una cadena lateral capaz de tomar parte en equilibrios ácido-base. Esto significa que pueden aceptar o donar un protón dependiendo del pH y otras especies presentes en la disolución. La serina y la treonina son capaces también de intercambiar protones con las moléculas circundantes. Sin embargo, los valores de pK_a de estos aminoácidos son extremadamente altos (>13,9), de modo que sus cadenas laterales están prácticamente siempre en una forma casi totalmente protonada.

25

30

El documento de patente EP 0513914 describe la estabilización de urato-oxidasa con ácido aspártico a una concentración de 750 mM. El documento de patente US 3051627 describe quimotripsina en agua con un aminoácido, a pH 4.

35

El documento de patente WO 03/009869 describe una composición que comprende un antígeno e histidina a pH 6-7, y que puede contener fosfato sódico. El documento de patente EP 1314437 describe una composición que comprende un anticuerpo en un tampón de glicina y/o un tampón de histidina a pH 5-8. El documento de patente EP 0948358 describe composiciones de interferón con acetato y arginina o glicina a pH 5,0, o con fosfato y arginina o glicina a pH 7,2.

40

Sumario de la invención

Conforme a un primer aspecto de la presente invención, se proporciona un método para aumentar la estabilidad de una proteína en un sistema acuoso, que comprende:

45

- (a) seleccionar un pH para la composición que está dentro de un intervalo de estabilidad de la proteína que es al menos 50% de la estabilidad máxima de la proteína con respecto al pH; y
- (b) preparar una composición que comprende la proteína y dos agentes estabilizantes, caracterizada porque:

50

- (i) los dos agentes estabilizantes tienen grupos ionizables capaces de intercambiar protones con la proteína y con los productos ionizados de la disociación del agua;

55

- (ii) los grupos ionizables consisten en primeros grupos que están cargados positivamente cuando están protonados y sin carga cuando están desprotonados, y segundos grupos que están sin carga cuando están protonados y cargados negativamente cuando están desprotonados, en los que los primeros y segundos grupos tienen valores de pK_a, respectivamente, de 1 a 5 unidades de pH superiores y de 1 a 5 unidades inferiores al pH de la composición;

y

60

- (iii) el pH de la composición está dentro de un intervalo de estabilidad de la proteína que es al menos 50% de la estabilidad máxima de la proteína con respecto al pH.

Conforme a un segundo aspecto de la presente invención, se proporciona un método para aumentar la estabilidad de una proteína en un sistema acuoso, que comprende:

- 5 (a) seleccionar un pH para la composición que está dentro de un intervalo de $\pm 0,5$ unidades de pH del pH al que la composición tiene una estabilidad máxima con respecto al pH; y
- (b) preparar una composición que comprende la proteína y dos agentes estabilizantes, caracterizada porque:
- (i) los dos agentes estabilizantes tienen grupos ionizables capaces de intercambiar protones con la proteína y con los productos ionizados de la disociación del agua;
- 10 (ii) los grupos ionizables consisten en primeros grupos que están cargados positivamente cuando están protonados y sin carga cuando están desprotonados, y segundos grupos que están sin carga cuando están protonados y cargados negativamente cuando están desprotonados, en los que los primeros y segundos grupos tienen valores de pK_a , respectivamente, de 1 a 5 unidades de pH superiores y de 1 a 5 unidades inferiores al pH de la composición;
- 15 y
- (iii) el pH de la composición está dentro de un intervalo de $\pm 0,5$ unidades de pH del pH al que la composición tiene una estabilidad máxima con respecto al pH.

20 La composición preparada conforme a la invención puede comprender una proteína y uno o más agentes estabilizantes como se ha definido anteriormente, adsorbidos sobre un sólido.

25 En una realización, un método para identificar un pH apropiado para optimizar la estabilidad durante la conservación de una proteína en un medio acuoso, comprende determinar un pH con un valor en el intervalo de 4 a 9 a, o cerca de un valor, al cual la proteína está en un estado de equilibrio de intercambio de protones con respecto a sus alrededores, que esté optimizado para la estabilidad durante la conservación, es decir, en un estado de equilibrio óptimo de intercambio de protones.

30 El estado de equilibrio óptimo de intercambio de protones existe a un pH al cual se cumplen las siguientes dos condiciones:

- (a) La probabilidad de protonación (P) de cada aminoácido individual en la secuencia proteínica (definida por el pK_a de cada aminoácido individual) está lo más lejos posible de 50% (es decir, 50% en forma protonada y 50% en forma desprotonada); y
- 35 (b) La protonación global de todos los aminoácidos en la secuencia proteínica (definida por los valores de pK_a de todos los aminoácidos en la secuencia) es lo más alta posible.

40 El estado de equilibrio óptimo de intercambio de protones, es decir, el estado al cual la estabilidad durante la conservación está optimizada, el aquél en el que se cumplen ambas condiciones a) y b) tanto como sea posible, alcanzándose un compromiso entre las dos condiciones para una optimización global.

45 Los valores de los criterios en las condiciones a) y b) son ambos dependientes del pH, y pueden calcularse para cualquier proteína a cualquier pH. El cálculo de la condición a) necesita que se conozca la secuencia de aminoácidos de la proteína (esto puede basarse en todos los aminoácidos, pero está basado preferiblemente en sólo los aminoácidos accesibles en la superficie de la proteína, en estado plegado, activo) y los valores de pK_a de la cadenas laterales de los aminoácidos de la proteína. Sólo los 7 aminoácidos protonables son de interés. El cálculo de la condición b) necesita también que se conozca el punto isoeléctrico de la proteína. De este modo, puede determinarse el pH al cual se cumplen tanto como sea posible ambas condiciones a) y b).

50 En particular, la probabilidad de protonación (P), a la que también se hace referencia en la presente invención como frecuencia de intercambio de protones, puede calcularse a cualquier pH como se ha descrito anteriormente, y representarse frente al pH para permitir la determinación del pH (en el intervalo de 4 a 9) al cual P está en un mínimo ($P_{\text{mínimo}}$).

La probabilidad de protonación (P) puede calcularse mediante la siguiente función matemática:

$$P = \frac{100000}{M} \times \sum_{\text{todas las cadenas laterales}} (N \times [HA] \times [A])$$

en la que

$$[HA] = \frac{1}{1 + \frac{10^{-pK_a}}{10^{-pH}}}$$

$$[A] = \frac{10^{-pK_a}}{10^{-pK_a} + 10^{-pH}}$$

M es el peso molecular relativo de la unidad proteínica;

N es el número de las cadenas laterales de aminoácidos dadas en la unidad proteínica; y

pK_a es el logaritmo negativo de la constante de disociación del ácido K_a de la cadena lateral de aminoácidos dada.

- 5 El ajuste para tener en cuenta la condición b) puede hacerse entonces calculando un valor optimizado de P (P_{optimizado}) mediante la siguiente ecuación:

$$P_{\text{optimizado}} = P_{\text{mínimo}} + (A \times pl) + B$$

en la que:

10 pl es el punto isoeléctrico de la proteína; y

A y B son constantes con los valores A = -1,192 y B = 10,587 si se usa la composición total de aminoácidos, y A = -0,931 y B = 8,430 si sólo se usan los aminoácidos accesibles en la superficie de la proteína.

- 15 El valor de pH que corresponde a P_{optimizado} que es inferior al valor de pH que corresponde al de P_{mínimo} puede determinarse entonces, dando el pH óptimo calculado para la proteína.

20 El uso de este algoritmo permite una predicción razonablemente exacta de un pH óptimo para tener beneficios de estabilidad durante la conservación, para una proteína particular. El pH óptimo exacto puede determinarse luego experimentalmente para cualquier sistema dado, incluyendo posiblemente uno o más aditivos como se ha discutido anteriormente.

Las referencias a un pH "de o cerca de" un valor, significa usualmente dentro de ± 0,5 unidades de pH, preferiblemente de ± 0,4 unidades de pH, más preferiblemente de ± 0,2 unidades de pH.

- 25 Los datos para obtener los valores del punto isoeléctrico y secuencias de aminoácidos, que incluyen la accesibilidad a la superficie de aminoácidos en la proteína en estado plegado, activo, están disponibles fácilmente para muchas proteínas a partir de fuentes diversas, siendo una fuente útil para los datos de secuencias el Protein Date Bank, banco de datos que está disponible en línea en www.rcsb.org/pdb. Otras fuentes de información, basadas en papel, están también disponibles.

30 En una realización adicional, un método para tratar una proteína en medio acuoso en condiciones iniciales de una estabilidad durante la conservación no óptima, para hacer la estabilidad durante la conservación más cercana al óptimo, comprende ajustar el pH a un valor en el intervalo de 4 a 9 a, o cerca de un valor, al cual la proteína está en un estado de equilibrio de intercambio de protones con respecto a sus alrededores, que esté optimizado para la estabilidad durante la conservación.

35 En una realización adicional, un método para proporcionar una proteína en medio acuoso con condiciones optimizadas para estabilidad durante la conservación, comprende proporcionar un pH en el intervalo de 4 a 9 a, o cerca de un valor, al cual la proteína está en un estado de equilibrio de intercambio de protones con respecto a sus alrededores, que esté optimizado para la estabilidad durante la conservación.

40

La proteína estabilizada puede estar en forma microbiológicamente estéril, y está contenida o conservada de forma práctica en un recipiente cerrado herméticamente y estéril, tal como un vial, jeringa o cápsula.

5 En una realización adicional, un método de conservación de una proteína en un medio acuoso, que incluye a temperatura ambiente y superior, comprende proporcionar el medio con un pH en el intervalo de 4 a 9 a, o cerca de un valor, al cual la proteína está en un estado de equilibrio de intercambio de protones con respecto a sus alrededores, que esté optimizado para la estabilidad durante la conservación.

10 En una realización adicional, un método de selección de condiciones capaces de proteger una proteína en un medio acuoso frente a la degradación térmica (que incluye a temperatura ambiente o superior), comprende seleccionar un pH en el intervalo de 4 a 9 a, o cerca de un valor, al cual la proteína está en un estado de equilibrio de intercambio de protones con respecto a sus alrededores, que esté optimizado para la estabilidad durante la conservación.

15 Teniendo una proteína a un pH adecuado, a un valor de, o cerca (usualmente dentro de 0,5 unidades de pH, preferiblemente dentro de 0,4 unidades de pH, y más preferiblemente, dentro de 0,2 unidades de pH) del cual el estado de equilibrio de intercambio de protones con respecto a sus alrededores está optimizado para la estabilidad durante la conservación, de modo que la estabilidad durante la conservación de la proteína (a temperatura ambiente (aproximadamente 20°C) o a una temperatura elevada) puede aumentarse, posiblemente de manera sustancial, comparada con la estabilidad durante la conservación de la proteína en un estado sin optimizar (usualmente a pH 7).

20 Las referencias a optimizar la estabilidad durante la conservación de una proteína significan moverse hacia el óptimo, sin lograr necesariamente el óptimo. Llevando la estabilidad durante la conservación lo más cerca del óptimo, de modo que la estabilidad durante la conservación de la proteína se mejora cuando se compara con las condiciones sin optimizar, por ejemplo, a pH 7.

25 La estabilidad durante la conservación puede aumentarse más de modo general mediante el uso de uno o más aditivos, que incluyen una o más especies capaces de intercambiar protones con la proteína con los valores de pK_a menos extremos que los del H_3O^+ (que tiene un pK_a de 13,99) y OH^- (que tiene un pK_a de -1,74). Se prefiere usar uno o más aditivos con grupos funcionales primeros y segundos como se ha discutido anteriormente.

30 Los aditivos están presentes adecuadamente en una cantidad tal que la concentración total de aditivos está en el intervalo de 1 mM a 1 M, preferiblemente de 1 mM a 200 mM, lo más preferiblemente de 5 mM a 100 mM. Se han obtenido buenos resultados con concentraciones bajas de aditivos (alrededor de 5 mM) con ciertas proteínas, obteniéndose un beneficio pequeño usando concentraciones más altas, aunque se han encontrado excepciones, por ejemplo, con catalasa, con la que concentraciones más altas de aditivos (100 mM) dieron una estabilidad significativamente mejor que concentraciones más bajas (10 mM). En ciertas aplicaciones prácticas, especialmente en aplicaciones médicas, será a menudo deseable usar las concentraciones de aditivos más bajas posibles.

40 Los descubrimientos que subyacen en la presente invención tienen una base teórica, como se discute en la presente invención, los cuales se han confirmado en la práctica. De hecho, esta memoria descriptiva describe cómo puede determinarse un sistema estabilizante para cualquier proteína, basado en la información disponible. Sin embargo, los beneficios de la invención también pueden lograrse sobre una base empírica, bien entendido que, para cualquier proteína en disolución, y dependiendo de la presencia de otros aditivos, hay una relación entre estabilidad y pH, y que hay un pH al cual la proteína tiene una estabilidad óptima. Basándose en la información presentada en la
45 presente invención, una persona de habilidad normal en la técnica puede determinar fácilmente los aditivos que son prometedores para ser útiles, y luego si pueden de hecho cumplir los criterios para los que está definida la invención.

50 Resulta que, antes de la presente invención, no se había apreciado la importancia del intercambio de protones con relación a la estabilidad durante la conservación de las proteínas. La presente invención permite hacer mejoras en la estabilidad durante la conservación de proteínas, seleccionando un pH apropiado, en combinación con dos o más aditivos.

55 La invención permite de este modo hacer mejoras en la estabilidad durante la conservación de proteínas en un medio acuoso, tales que las proteínas pueden conservadas durante periodos prolongados de tiempo a temperatura ambiente, sin una pérdida significativa de actividad, evitando de este modo la necesidad de congelación o refrigeración. Aunque la mayor parte de los ejemplos experimentales usados en la presente invención usan temperaturas elevadas (típicamente entre 55°C y 65°C) para acelerar la pérdida de actividad, los resultados proporcionan una indicación muy buena de la estabilidad de las proteínas a temperaturas inferiores, que incluyen temperaturas ambiente.

60 La invención es aplicable a un amplio intervalo de proteínas, que incluyen polipéptidos, etc., como se ha discutido anteriormente, que incluyen vacunas de proteínas y proteínas terapéuticas, y que incluyen proteínas/polipéptidos relativamente pequeños tales como glucagón (peso molecular relativo de 3550) e insulina (peso molecular relativo de 6000).

5 La composición preparada conforme a la presente invención puede comprender una proteína y uno o más aditivos adsorbidos sobre un adyuvante. El, o cada, aditivo se selecciona como si estuviera presente en una disolución acuosa, como se ha definido anteriormente (pero no es necesariamente soluble en agua). Tal composición puede obtenerse mediante adsorción, sobre un adyuvante, de los componentes que proceden de una composición acuosa preparada conforme a la invención.

Descripción de los dibujos

10 La figura 1 es un gráfico de % de la forma protonada/desprotonada frente al pH para los 7 aminoácidos protonables, representando la línea continua la forma protonada y representando la línea discontinua la forma desprotonada;

La figura 2 es un gráfico del producto de la concentración normalizada de la forma protonada [HA] y la forma desprotonada [A] en unidades arbitrarias, frente al pH, para los 7 aminoácidos protonables;

15 La figura 3 es un gráfico de la frecuencia de intercambio de protones (relativa al tamaño de la proteína) en unidades arbitrarias, frente al pH, para la enzima papaína, que ilustra la velocidad relativa de intercambios de protones sobre la superficie de la molécula de papaína;

20 La figura 4 es un gráfico de % de protonación de las cadenas laterales de aminoácidos de la glucosa-oxidasa y papaína frente al pH;

25 La figura 5 es un par de gráficos de frecuencia de intercambio de protones (relativa a tamaño de la proteína) en unidades arbitrarias, frente al pH, para glucosa-oxidasa y peroxidasa de rábano picante, que muestran la diferencia entre el pH óptimo teórico para la estabilidad de proteínas calculado sobre la base de la frecuencia de intercambio de protones global mínima y el pH óptimo real;

La figura 6 es un gráfico de concentración (en μM) frente al pH para H_3O^+ y OH^- en disolución acuosa, a 25°C ;

30 La figura 7 es un gráfico de frecuencia de intercambio de protones (relativa al tamaño de la proteína) en unidades arbitrarias P frente al pH, que ilustra la estimación del pH óptimo para la estabilidad de la proteína, basada en una secuencia conocida de aminoácidos y el punto isoeléctrico conocido de una proteína;

35 La figura 8 es un gráfico similar a la figura 3, que ilustra la estimación del pH óptimo para la estabilidad de la glucosa-oxidasa, basada en una secuencia conocida de aminoácidos y el punto isoeléctrico conocido de la proteína;

La figura 9 es un gráfico similar a la figura 8, para la catalasa;

La figura 10 es un gráfico similar a la figura 8, para la papaína;

40 La figura 11 es un gráfico similar a la figura 8, para glutamato-deshidrogenasa, y;

45 La figura 12 es un gráfico de la recuperación de la actividad de urato-oxidasa tras incubación a 60°C , en una formulación que contiene (A) tampón de fosfato (20 mM, pH 7,0), (B) tampón de TRIS/HCl (20 mM, pH 7,2), (C) tampón de borato (20 mM, pH 9,0), (D) purina (20 mM) + succinato (20 mM) pH 9,0, (E) TRIS (20 mM) + serina (20 mM) pH 8,8. [urato-oxidasa] = 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

Descripción de realizaciones preferidas

50 Ciertas características preferidas de la invención se definen en las subreivindicaciones.

55 Se apreciará que esta invención se refiere a la estabilidad de proteínas, particularmente a la estabilidad de proteínas en un medio acuoso, por ejemplo, en disolución acuosa, en forma de gel acuoso y en estado sólido (u otro estado no líquido), en el que está presente agua en estado libre o unido, y tiene que ver con la estabilidad durante la conservación de proteínas, es decir, estabilidad con el tiempo, que incluye estabilidad a temperaturas ambiente (aproximadamente 20°C) y superiores. La expresión "proteína" se usa en la presente invención para incluir moléculas o complejos moleculares que consisten en un único polipéptido, moléculas o complejos moleculares que comprenden dos o más polipéptidos, y moléculas o complejos moleculares que comprenden uno o más polipéptidos junto con uno o más restos no polipeptídicos, tales como grupos prostéticos, cofactores, etc. La expresión "polipéptido" tiene la intención de incluir polipéptidos que comprenden restos que no son aminoácidos unidos de forma covalente, tales como polipéptidos glucosilados, lipoproteínas, etc. En particular, la invención se refiere a 60 moléculas con una o más actividades biológicas de interés, actividad o actividades que dependen de manera crítica de la retención de una estructura tridimensional particular o natural en al menos una parte crítica de la molécula o complejo molecular. En general, la invención puede ser aplicable a polipéptidos con un peso molecular de al menos 2000 (es decir, que consisten en al menos aproximadamente 15 aminoácidos), en los que al menos pueden

formarse motivos básicos de estructura secundaria o terciaria posiblemente importantes para la función de la proteína.

5 La invención es aplicable a cualquier sistema en el que son importantes la retención de características estructurales de una proteína, en particular la estructura secundaria, terciaria y cuaternaria, y la retención de características funcionales de la proteína, en particular la actividad enzimática, unión a antígeno, unión a receptor, unión a ligando u otras uniones específicas.

10 La aplicación de la invención reduce significativamente la probabilidad de un cambio conformacional irreversible y una agregación irreversible de una proteína, y pérdida consiguiente de actividad de la proteína.

La invención es aplicable a la estabilización de una proteína durante toda la vida del producto, que incluye aislamiento o expresión, purificación, transporte y conservación.

15 Por lo que se refiere al tamaño molecular, la invención es aplicable a polipéptidos con un peso molecular relativo de al menos 2000, en los que al menos es probable que se formen motivos básicos de estructura secundaria o terciaria. No hay un límite superior de peso molecular relativo que limitara la aplicación de la presente invención.

20 Por lo que se refiere a la estructura secundaria, la invención es aplicable a proteínas que contienen cualquier proporción de hélice α , lámina β y ovillo aleatorio.

25 Por lo que se refiere a la estructura terciaria, la invención es aplicable tanto a proteínas globulares como a proteínas fibrilares. La invención es aplicable a proteínas cuya estructura terciaria se mantiene solamente por medio de interacciones no covalentes, así como a proteínas cuya estructura terciaria se mantiene mediante la combinación de interacciones no covalentes y uno o más puentes de disulfuro.

Por lo que se refiere a la estructura cuaternaria, la invención es aplicable a proteínas monoméricas, así como a proteínas que consisten en dos, tres, cuatro o más subunidades. La invención es aplicable también a conjugados de proteínas.

30 Por lo que se refiere a componentes estructurales no proteínicos, la invención es aplicable a proteínas que no contienen ningún componente no peptídico, así como a glicoproteínas, lipoproteínas, nucleoproteínas, metaloproteínas y otros complejos que contienen proteínas, en los que la proteína representa al menos 10% de la masa total. Es aplicable a proteínas que no necesitan un cofactor par su función, así como a proteínas que necesitan una coenzima, grupo prostético o un activador para su función.

35 La invención es aplicable a proteínas disueltas libremente en disoluciones acuosas, o presentes en un sistema acuoso como dispersión o suspensión, así como a proteínas unidas a sustratos sólidos tales como adyuvantes de vacunas o membranas celulares, por medio de interacciones hidrófobas, iónicas o de intercambio de ligando. La invención es aplicable también a proteínas disueltas en forma de gel acuoso y a proteínas en estado sólido, en las que se ha retirado el agua parcial o completamente a partir de una disolución acuosa, mediante secado o liofilizado, en las que todavía está presente agua libre o unida.

40 La proteína puede ser natural o recombinada, glucosilada o no glucosilada, autolítica o no autolítica. La invención es particularmente aplicable a los siguientes grupos de proteínas.

45 Hormonas proteínicas o peptídicas y factores de crecimiento

50 La función de las hormonas proteínicas o peptídicas y factores de crecimiento depende de su capacidad para fijarse a un receptor específico. Tal fijación está ligada estrechamente a la conformación de la proteína. La retención de la estructura tridimensional de la proteína, o al menos la estructura 3D de dominios clave, es por lo tanto fundamental para su función. La retención de las características estructurales y funcionales es también de la mayor importancia para la aprobación regulatoria de tratamientos con proteínas. Los ejemplos de hormonas proteínicas o peptídicas terapéuticas incluyen:

- 55 Insulina (tratamiento de la diabetes)
- Glucagón (tratamiento de la diabetes)
- Hormona del crecimiento humana
- Gonadotropina
- Hormona estimulante del tiroides humana (tratamiento del cáncer de tiroides)
- 60 Factor estimulante de colonias de granulocitos (usado como parte de la quimioterapia)

Enzimas terapéuticas

65 La función de las enzimas terapéuticas depende directamente de su estructura molecular y conformación. Los cambios conformacionales irreversibles y la agregación irreversible conducen a la inactivación de las enzimas

terapéuticas. La retención de las características estructurales de la proteína es también un prerrequisito esencial de la aprobación regulatoria. Los ejemplos de enzimas terapéuticas incluyen:

- 5 Estreptocinasa (agente trombolítico para el tratamiento de un accidente cerebrovascular isquémico)
 Asparaginasa
 Urato-oxidasa
 Papaína (desbridamiento del tejido)

10 Vacunas

15 La actividad inmunógena de las vacunas proteínicas depende (en gran parte) de la integridad estructural de los antígenos proteínicos clave, especialmente con relación a los epítomos conformacionales (en los que se necesita que los anticuerpos se fijen a regiones dispares de la cadena polipeptídica reunidas mediante un plegamiento natural). Los cambios conformacionales irreversibles y una agregación irreversible conducen a la inactivación de las vacunas. Las mismas consideraciones son aplicables a proteínas adsorbidas sobre partículas, tales como partículas de alúmina, u otras superficies (no en partículas), cuando regiones sustanciales de cada molécula de proteína están todavía en plena interacción con el agua del disolvente. Esto es particularmente importante en la distribución de vacunas en el tercer mundo, cuando el mantenimiento de la cadena del frío es muy difícil o imposible, en parte debido a limitaciones prácticas o logísticas y en parte debido al coste. La presente invención puede aplicarse a vacunas de proteínas recombinadas así como a virus atenuados o vacunas de células completas, a condición de que los antígenos clave consistan en cadenas polipeptídicas. Los ejemplos de tales vacunas incluyen:

- 25 Vacuna antihepatitis B
 Vacuna antipalúdica
 Vacuna contra el papiloma humano
 Vacuna contra la meningitis A
 Vacuna contra la meningitis C
 Vacuna antitosferínica
 Vacuna antipoliomiéltica

30 Anticuerpos terapéuticos

35 La función de los anticuerpos terapéuticos está basada en sus interacciones específicas con los antígenos diana. De este modo, para mantener su función, la retención de la estructura tridimensional es esencial para la duración de su periodo de estabilidad. Aunque son generalmente muy estables a temperatura ambiente, debido a la estructura rígida y estable intrínseca del plegamiento o dominio de la inmunoglobulina, se puede sacar provecho de los anticuerpos a partir de la presente invención, aumentando más su estabilidad durante la conservación. Los ejemplos de anticuerpos terapéuticos que pueden usarse, por ejemplo, en tratamiento antineoplásico, incluyen:

- 40 Anticuerpo monoclonal antirreceptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR)
 Anticuerpo monoclonal anti-HER2 (tratamiento contra el cáncer de mama)
 Anticuerpo monoclonal anti-CD52 (tratamiento contra la leucemia linfocítica crónica)
 Anticuerpo monoclonal anti-CD20 (tratamiento contra linfoma agresivo)

45 Interferones

50 Los interferones son polipéptidos bastante inestables de importancia terapéutica, que se usan, por ejemplo, en el tratamiento contra la esclerosis múltiple. La aplicación de la presente invención puede aumentar el periodo de estabilidad y la eficacia de coste de los interferones. El interferón β es el principal ejemplo actual.

50 Otras proteínas terapéuticas

55 Los siguientes son ejemplos de otras proteínas terapéuticas que pueden sacar provecho de la aplicación de la presente invención, por lo que se refiere a eficacia de coste y periodo de estabilidad mejorado, particularmente en disolución acuosa:

- 60 Eritropoyetina (que estimula la producción de eritrocitos)
 Darbepoyetina α (que estimula la producción de eritrocitos)
 Factores de la coagulación de la sangre, principalmente factor VIII y factor IX (tratamiento y control de la hemofilia)
 Inmunodepresores (tratamiento de diversas enfermedades, tal como asma, rinitis alérgica o esclerosis múltiple)
 Seroalbúmina humana
 Proteína C (agente antitrombótico)

Proteínas diagnósticas e industriales

5 La retención de las características estructurales es fundamental para la función de las proteínas diagnósticas, particularmente enzimas y anticuerpos. En particular, los patrones de referencia en kit de los analitos, a través de los cuales se calibra el análisis y se somete a control de calidad (QC), deben estabilizarse rigurosamente, ya que cualquier desviación en su integridad provocará una desviación resultante en la exactitud de todo el kit. Un deterioro de la actividad puede conducir a resultados falsos o malas prestaciones (por ejemplo, un funcionamiento lento del procedimiento). La estabilidad de la actividad funcional de las proteínas diagnósticas a lo largo de toda la vida del producto es por lo tanto de la mayor importancia. Los fabricantes de productos diagnósticos ansían encontrar enfoques y formulaciones que eliminarían la costosa liofilización, que causa sustanciales cuellos de botella durante la elaboración. Los ejemplos de proteínas diagnósticas incluyen:

15 Anticuerpos monoclonales
 Anticuerpos policlonales
 Conjugados de anticuerpo-enzima
 Oxidasas tales como glucosa-oxidasa, galactosa-oxidasa, colesterol-oxidasa / peroxidasa
 Fosfatasa alcalina
 20 Deshidrogenasas tales como glutamato-deshidrogenasa, glucosa-deshidrogenasa / isomerasas tales como invertasa
 Hidrolasas tales como tripsina, o quimotripsina
 Patrones de referencia para análisis integrales, proporcionados en forma de kit, tales como hormonas, factores de crecimiento, proteínas microbianas, proteínas metabólicas, formas solubles de proteínas estructurales, etc.

25 Los ejemplos de proteínas industriales incluyen:

Amilasa
 Proteasa
 Lipasa

30

Patrones de referencia internacionales de proteínas terapéuticas, vacunas y proteínas diagnósticas

35 Los patrones de referencia de proteínas terapéuticas o diagnósticas son de gran importancia para la normalización de procedimientos terapéuticos y diagnósticos. La estabilidad de patrones de referencia es de una importancia fundamental. Un amplio intervalo de patrones de referencia basados en proteínas es por lo tanto un objetivo ideal para la presente invención.

40 La proteína usada en la invención puede mantenerse sustancialmente en su estado natural. Para los fines de esta memoria descriptiva, la expresión "proteína natural" se usa para describir una proteína que conserva su estructura terciaria, y que se distingue de proteínas que han experimentado un grado de despliegue o desnaturalización. Una proteína natural puede incorporar alguna modificación química, por ejemplo, desamidación, antes que una modificación física.

45 La presente tecnología de estabilización puede aplicarse a estabilizar proteínas adsorbidas sobre superficies sólidas tales como alúmina. En algunos casos, es beneficioso preincubar la superficie del sólido (tal como partículas de alúmina) en la formulación estabilizante, antes de la adsorción de la proteína sobre la superficie. Esto puede dar como resultado una mayor estabilidad de la proteína.

50 Para el caso particular de proteínas inmunógenas, por ejemplo, fosfoproteínas, tales como hepatitis B, con la finalidad de usarse como vacunas, y que pueden usarse por lo tanto en asociación con un adsorbente/adyuvante tal como alúmina, y particularmente en el caso en el que puede producirse un intercambio de ligando, el fosfato es un agente estabilizante preferido. Parece que el fosfato puede proporcionar propiedades deseables adicionales, por ejemplo, cuando las formulaciones contienen aniones de fosfato (> 20 mM). Las razones detrás de la importancia del fosfato no están completamente claras, pero se cree que el anión de fosfato juega un papel en una unión apropiada de la vacuna sobre la alúmina (véase, por ejemplo, Iyer S., y cols.: *Vaccine* 22 (2004) 1475-1479). Como se ha descrito en el ejemplo 8, se ha observado una recuperación de > 95% de actividad antigénica de la vacuna antihepatitis B tras conservación a 55°C durante 7 semanas, en la formulación basada en la nueva tecnología de estabilización, en presencia de anión de fosfato. Se llevaron a cabo experimentos adicionales para asegurar que la vacuna permanecía adsorbida fuertemente sobre el adyuvante de alúmina, y no se produjeron cambios en la velocidad de sedimentación de las partículas de vacuna/albúmina. Aunque el uso de fosfato es muy común como tampón de pH en formulaciones farmacéuticas, su aplicación en la presente invención no es usual, ya que el pH de la formulación es de 5,2, es decir, un estado en el que la capacidad tamponante del fosfato es insignificante.

65 Sin desear estar limitados por la teoría, la presente invención está basada al menos en parte en la comprensión que cada intercambio de protón en la dirección ácido-base energéticamente favorable, está acompañado por una

liberación de energía proporcional a la diferencia de pK_a entre la cadena lateral de aminoácido y la molécula con la cual se intercambia el protón. La energía de tal transferencia se disipará en el medio circundante, en forma de entalpía (liberación de calor) y cambio en la entropía. Esto puede conducir a un cambio temporal en las características estructurales y energéticas en las proximidades del aminoácido implicado. Aunque no se puede descartar que tal suceso pueda dar incluso como resultado la rotura del enlace químico, la posibilidad de tal efecto es indudablemente muy pequeña. Sin embargo, es considerablemente más probable que tal suceso pueda dar como resultado un cambio significativo (aunque temporal y localizado) en la conformación de la proteína alrededor del aminoácido en cuestión. En caso de que varios de tales sucesos se produzcan simultáneamente en diversas partes de la molécula de la proteína, esto podría conducir a la pérdida de la estructura terciaria natural (“despliegue”) y una pérdida irreversible posterior de la función biológica de la proteína (por ejemplo, actividad enzimática).

Para estabilizar la molécula de proteína es necesario reducir al mínimo la frecuencia de los intercambios de protones en la superficie de la proteína. Los tres siguientes aspectos relacionados con la energía de los intercambios de protones se consideran en el presente modelo:

- (1) La estabilidad de la proteína puede aumentarse reduciendo al mínimo la frecuencia de intercambios de protones en su superficie.
- (2) Ya que la energía libre de todas las cadenas laterales de aminoácidos protonables es inferior en la forma protonada que en la forma desprotonada, la estabilidad de la proteína puede aumentarse manteniendo una proporción de cadenas laterales en forma protonada lo más alta posible.
- (3) Ya que el equilibrio dinámico ácido-base de las cadenas laterales de aminoácidos en la superficie de una proteína se mantiene mediante intercambios continuos de protones con las moléculas circundantes, y ya que la cantidad de energía liberada durante tales intercambios de protones depende de la diferencia de pK_a entre las especies implicadas, es beneficioso para la estabilidad de la proteína sustituir los intercambios de protones “energéticos” (especialmente los que implican H_3O^+ y OH^-) con protones “ligeros” (que implican especies químicas con valores de pK_a menos extremos). Esto puede lograrse reduciendo al mínimo la concentración de H_3O^+ y OH^- , e incorporando especies capaces de intercambiar protones con valores de pK_a menos extremos.

Frecuencia de intercambio de protones

El pK_a de un compuesto es una indicación de su comportamiento ácido-base. El valor varía con la temperatura, y debe notarse que el valor de pK_a de una cadena lateral de aminoácido no es necesariamente el mismo que el del aminoácido libre (aunque la diferencia no debe de ser demasiado grande). Los valores de pK_a de las cadenas laterales de los aminoácidos de la proteína determinan la proporción relativa de formas protonadas y desprotonadas a un pH dado. Esto se muestra en la figura 1.

La frecuencia (o velocidad) de intercambio de protones entre una cadena lateral de aminoácido y las moléculas circundantes será máxima si el $pH = pK_a$ del grupo protonable de la cadena lateral del aminoácido. A este pH, se mantiene el equilibrio, de modo que hay una cantidad igual de forma protonada y desprotonada de la cadena lateral. Esto resulta en la velocidad máxima del ciclo de protonación/desprotonación. Si el pH está lejos del pK_a del aminoácido, entonces la velocidad del ciclo de protonación/desprotonación se reduce, por la baja proporción o de la forma protonada (a un pH alto) o de la forma desprotonada (a un pH bajo). Por ejemplo, en el caso del ácido glutámico, la máxima frecuencia de intercambio de protones se producirá a un pH alrededor de 4,15, en el caso de histidina alrededor de pH 6, etc. La velocidad relativa de los intercambios de protones de los siete aminoácidos se muestra como función del pH en la figura 2. La velocidad relativa se expresa como el producto de las concentraciones de la forma protonada (HA) y la desprotonada (A) de la cadena lateral del aminoácido, con la concentración total adimensional de la cadena lateral del aminoácido seleccionada arbitrariamente como 1. El valor del eje y que corresponde a la velocidad máxima de intercambio de protones es de este modo $0,5 \times 0,5 = 0,25$.

La estabilidad de la proteína puede aumentarse reduciendo al mínimo la frecuencia global de los intercambios de protones, es decir, la suma de todos los sucesos de intercambio de protones en la superficie de la proteína. Un ejemplo de la frecuencia global de los intercambios de protones se muestra en la figura 3 para la enzima papaína. Esto se calculó sumando las frecuencias de intercambio de protones de los aminoácidos individuales (como se muestra en la figura 2), mientras que la contribución relativa de cada aminoácido se determinó por su abundancia relativa en la secuencia de papaína. El pH óptimo para la estabilidad de la papaína se halló experimentalmente que estaba entre 5,8 y 6,2. Esto corresponde aproximadamente al mínimo de la velocidad de intercambio de protones (figura 3).

Sin embargo, la frecuencia relativa del intercambio de protones es sólo uno de los factores que contribuyen a la estabilidad/inestabilidad de la proteína, y ha de considerarse en el contexto de otros factores que contribuyen (véase más adelante). Esto significa que, aunque que la frecuencia del intercambio de protones es una buena indicación del

pH óptimo, la estabilidad más alta no se logra necesariamente en el mínimo del perfil de frecuencia de intercambio de protones. Esto se demuestra más adelante en alguno de los ejemplos.

Reducción al mínimo de la energía libre (Gibbs) de las cadenas laterales

La energía libre de Gibbs de todas las cadenas laterales de aminoácidos protonables es inferior en la forma protonada que en la forma desprotonada. Esto es porque los pares de electrones libres (a los que se une el protón) tienen una energía inferior en presencia del protón en comparación con en su ausencia. La unión de los protones a las cadenas laterales de aminoácidos reduce de este modo la energía libre global de toda la proteína. La estabilidad de la proteína puede aumentarse por lo tanto aumentando al máximo la protonación de los aminoácidos sobre su superficie.

El tanto por ciento de la protonación global en la superficie de dos proteínas modelo (glucosa-oxidasa y papaína) como función del pH se muestra en la figura 4. Se calculó sumando la proporción de la forma protonada de todos los aminoácidos protonables en la secuencia de las dos proteínas. Mientras que la glucosa-oxidasa es un ejemplo de una proteína con un punto isoelectrónico bajo ($pI =$ aproximadamente 4,4), la papaína es una enzima con un punto isoelectrónico muy alto ($pI =$ aproximadamente 8,7). Esto se refleja en el perfil de protonación como se muestra en la figura 4. El tanto por ciento de la protonación de las cadenas laterales a un pH neutro (-7) es considerablemente superior en el caso de la papaína que en el caso de la glucosa-oxidasa. Habrá por lo tanto una mayor tendencia a mover el pH óptimo hacia un pH inferior en el caso de la glucosa-oxidasa que en el caso de la papaína.

Se encontró experimentalmente que el pH óptimo real para la estabilidad de la enzima está siempre al menos ligeramente (o más considerablemente) desplazado hacia un pH bajo desde pH óptimo teórico calculado sobre la base de la frecuencia de intercambio de protones. El grado de protonación es aparentemente el parámetro fundamental que determina cuánto se desplaza el óptimo hacia un pH bajo desde el pH óptimo teórico calculado sobre la base de la frecuencia de intercambio de protones. Ya que el grado de protonación está muy ligado al pI de la proteína, este efecto puede resumirse como sigue: mientras que las proteínas con un alto pI sólo tendrán una pequeña tendencia a desplazar su pH óptimo real hacia un pH bajo, las proteínas con un bajo pI tendrán una tendencia mayor a desplazar el pH óptimo en esta dirección. La comparación se demuestra mejor con un ejemplo práctico de dos proteínas con valores de pI muy diferentes, es decir, glucosa-oxidasa y peroxidasa de rábano picante (HRP). Como se muestra en la figura 5, el pH óptimo teórico calculado sobre la base de la frecuencia de intercambio de protones global es aproximadamente de 7,5 en el caso de glucosa-oxidasa, y 7,9 en el caso de HRP. El pH óptimo real de ambas de estas proteínas es inferior al teórico. Esto significa que las proteínas están "sacrificando" una pequeña parte de la estabilidad lograda mediante la reducción al mínimo de la frecuencia de intercambio de protones, para lograr una mayor protonación de su superficie. Se ha mostrado repetidamente que la parte que la enzima sacrifica (como se demuestra en la figura 5) es inversamente proporcional al pI de la proteína. De este modo, la tendencia de la glucosa-oxidasa para desplazar su pH óptimo a valores inferiores es mucho mayor que la del HRP (figura 5).

Reducción al mínimo de la energía liberada durante los intercambios de protones

La cantidad de energía liberada durante los intercambios de protones depende de la diferencia de pK_a entre las especies implicadas. Por lo tanto, es beneficioso para la estabilidad de la proteína reducir al mínimo el impacto de las interacciones continuas con compuestos de pK_a extremos (especialmente los que implican H_3O^+ y OH^-) y asegurar que éstas se reemplacen por interacciones con compuestos con valores de pK_a menos extremos.

Las especies dominantes con "valores de pK_a extremos" en disoluciones acuosas son H_3O^+ y OH^- . Cuanto más extremo es el valor de pK_a de una especie, menos probable es que esta especie se encuentre en la forma de "alta energía" (es decir, en forma protonada en el caso de un ácido fuerte o en forma desprotonada en el caso de una base fuerte). Puede decirse que, cuanto más perjudicial sea la especie para la proteína, menos probable es que se encuentre en la disolución acuosa, siendo éste un mecanismo de autorregulación útil que protege a la proteína. Tal mecanismo de autorregulación también se aplica a H_3O^+ y OH^- . Sin embargo, estas dos especies proceden del agua (mediante protonación o desprotonación), cuya concentración en disoluciones acuosas es extremadamente alta ($\sim 55,5$ M) lo que, a su vez, aumenta la abundancia relativa estas especies de "alta energía". Por lo tanto, dado el pK_a extremo de H_3O^+ y OH^- , la concentración de estas especies será siempre muy alta (por ejemplo, tres órdenes de magnitud superior a la concentración de otras especies de pK_a comparable que proceden de un aditivo presente en una concentración de 55,5 mM).

Debe notarse que hay otras especies con valores de pK_a extremos que pueden usarse comúnmente junto con formulaciones de enzimas. Uno de tales ejemplos es un catión de sodio (Na^+). El pK_a de Na^+ a 25°C es 14,8 (Handbook of Chemistry and Physics, 1998). Esto significa que los intercambios de protones entre el Na^+ y una molécula de proteína pueden ser bastante "energéticos". Debido al mecanismo protector de autorregulación mencionado anteriormente, la concentración de la "forma de alta energía" de Na^+ será considerablemente inferior a cualquier pH dado que la de la igualmente "energética" OH^- (es decir, una especie con un pK_a muy similar al del catión de sodio). Sin embargo, en varios experimentos (especialmente si se usaron concentraciones superiores de

sales de Na^+), se observó todavía un efecto de desestabilización de Na^+ en proteínas modelo. Por contraste, no se observó un efecto de desestabilización para el catión amonio (NH_4^+), una especie con un pK_a considerablemente menos extremo (aproximadamente 9).

5 Aunque los intercambios de protones “energéticos” destructivos entre las cadenas laterales de aminoácidos y H_3O^+ u OH^- no pueden evitarse completamente, es posible reducir considerablemente su probabilidad termodinámica, y hacer de este modo la enzima más estable. Esto puede lograrse ajustando el pH a un valor tal en el que la capacidad destructiva de los intercambios de protones “energéticos” sea mínima, debido al estado de protonación de las cadenas laterales de los aminoácidos de la proteína, y debido a las concentraciones de H_3O^+ y OH^- ; e
10 incorporando un compuesto o idealmente una combinación de protones capaces de intercambios “ligeros” de protones con las cadenas laterales de aminoácidos sobre la superficie de la molécula de proteína. Esos intercambios “ligeros” competirán con los intercambios “energéticos” destructivos provocados por H_3O^+ u OH^- y reducir su impacto.

15 Las concentraciones de H_3O^+ y OH^- en disoluciones acuosas a 25°C a un pH dado se muestran en la figura 6. Sería lógico afirmar que el pH óptimo para la estabilidad de la proteína debe ser 7, porque este es el pH en el que la concentración total de H_3O^+ u OH^- es mínima (200 nN). Para comparar, la concentración total de H_3O^+ y OH^- a pH 6 ó 8 es $1,1 \mu\text{M}$, a pH 5 ó 9 es $10,01 \mu\text{M}$ y así sucesivamente. Sin embargo, esto sería el caso sólo si la concentración de H_3O^+ y OH^- fuera el único parámetro que determina la probabilidad de intercambios de protones destructivos. La
20 probabilidad depende también del estado de protonación de la proteína al pH dado, como se ha discutido anteriormente. Además, depende de la composición de aminoácidos global de la proteína, lo que determina si la proteína es globalmente más sensible al ataque de H_3O^+ o al ataque de OH^- . El pH óptimo puede estar de este modo bastante distante de 7.

25 El impacto energético de los intercambios de protones entre las cadenas laterales de aminoácidos y el H_3O^+ u OH^- está indicado en la tabla 1. El impacto está expresado como la diferencia en pK_a entre las especies que colisionan (siendo proporcional la diferencia en pK_a a la energía liberada durante la colisión).

Tabla 1

Aminoácido	pK_a	$\text{pK}_a - \text{pK}_{\text{H}_3\text{O}^+}$	$\text{pK}_{\text{OH}^-} - \text{pK}_a$
Ácido aspártico	3,71	5,45	10,28
Ácido glutámico	4,15	5,89	9,84
Histidina	6,04	7,78	7,95
Cisteína	8,14	9,88	5,85
Tirosina	10,10	11,84	3,89
Lisina	10,67	12,41	3,32
Arginina	12,1	13,84	1,89

30 Mientras que en el caso de los aminoácidos más ácidos (ácido aspártico, ácido glutámico e histidina) es la interacción con OH^- lo que da como resultado más liberación de energía, en el caso de los ácidos más alcalinos es la interacción con H_3O^+ lo que es más desestabilizante.

35 Ya que la tendencia de la proteína para mantener la mayor cantidad posible de cadenas laterales de aminoácidos en la forma protonada de baja energía, puede asumirse que las tres cadenas laterales más alcalinas (tirosina, lisina y arginina –todas con $\text{pK}_a > 10$) estarán virtualmente protonadas de manera completa en las condiciones óptimas, y su implicación en el intercambio de protones será por lo tanto mínima. Esta asunción está de acuerdo con los resultados experimentales: los pH óptimos de las proteínas modelo ensayadas variaron entre 4,8-8,0. Incluso al pH
40 8, la tirosina, lisina y arginina están casi completamente protonadas. Es por lo tanto la abundancia relativa de la cisteína, histidina, ácido glutámico y ácido aspártico lo que determina la sensibilidad de la proteína a H_3O^+ y OH^- , y de este modo las condiciones óptimas para la estabilidad de la proteína.

45 Habrá una tendencia de las proteínas con un pI bajo a desplazar su pH óptimo hacia valores inferiores. Esto es porque las proteínas de bajo pI contienen una mayor proporción de los aminoácidos más ácidos (ácido aspártico y ácido glutámico), que son particularmente sensibles al ataque de OH^- (véase la tabla 1).

50 El ajuste de pH no es la única medida que puede tomarse para mejorar la estabilidad de la proteína. La estabilidad puede mejorarse más añadiendo compuestos que pueden tomar parte en intercambios de protones “ligeros” con las cadenas laterales de los aminoácidos de la proteína, y reducir más de este modo la probabilidad de los intercambios de protones “energéticos” destructivos con H_3O^+ u OH^- .

55 Se ha encontrado experimentalmente que los mejores resultados pueden lograrse si dos grupos funcionales ácido-base están incorporados en los aditivos. El primer grupo funcional tiene un pK_a al menos una unidad superior al pH óptimo, y está cargado positivamente en el pH óptimo. Esto significa que la carga del grupo cambia desde neutra hasta positiva mientras acepta el protón (por ejemplo, grupo amino, purina, TRIS, etc.). El segundo grupo funcional tiene un pK_a al menos una unidad inferior al pH óptimo, y está cargado negativamente en el pH óptimo. Esto significa

que la carga del grupo cambia desde negativa hasta neutra mientras acepta el protón (por ejemplo, ácido carboxílico).

5 Puede usarse una pequeña cantidad de tampón junto a los aditivos para mantener el pH óptimo. La incorporación de los aditivos puede afectar ligeramente el pH óptimo para la estabilidad de la proteína (dentro de aproximadamente 0,5 unidades de pH, dependiendo de la naturaleza y cantidad de los aditivos).

10 También se ha encontrado que un exceso relativo del primer grupo (es decir, el cargado positivamente en el pH óptimo) es beneficioso para la estabilidad de la proteína. Esto puede explicarse especulativamente por la formación de enlaces iónicos con las cadenas laterales cargadas negativamente de ácidos aspárticos y ácidos glutámicos (estas cadenas laterales estarán desprotonadas en su mayor parte en el pH óptimo en el caso de prácticamente cada enzima – el pH óptimo tendría que estar muy por debajo de 4 para que estas cadenas laterales se volvieran protonadas en su mayor parte). Tales enlaces iónicos podrían reducir la energía de Gibbs del par de electrones libre de estas cadenas laterales –justamente como lo hace la unión de un protón.

15 Se ha obtenido un algoritmo para permitir una buena predicción del pH óptimo, basado en la secuencia conocida de aminoácidos de la proteína y su punto isoeléctrico. Aunque la predicción puede lograrse usando la secuencia de aminoácidos total, se recomienda tener en cuenta solamente las cadenas laterales de aminoácidos que sean accesibles en la superficie de la proteína. Tanto las secuencias de aminoácidos totales como la accesibilidad de los aminoácidos individuales en la estructura de la proteína pueden encontrarse usando la base de datos de información del Protein Data Bank (<http://www.rcsb.org/pdb>). Para la estimación de la accesibilidad de los aminoácidos, es necesario descargar el programa informático para proteínas DEEP VIEW (disponible en <http://www.expasy.org/spdbv>).

25 El algoritmo consiste en tres etapas, como sigue:

Etapla 1: (puede hacerse fácilmente en MS-Excel). Calcúlese la función de frecuencia de intercambio de protones (P) y represéntese frente al pH:

30
$$P = \frac{100000}{M} \times \sum_i^7 (N \times [HA] \times [A])$$

en la que

35
$$[HA] = \frac{1}{1 + \frac{10^{-pK_a}}{10^{-pH}}}$$

40
$$[A] = \frac{10^{-pK_a}}{10^{-pK_a} + 10^{-pH}}$$

45 M es el peso molecular relativo de la unidad proteínica;
N es el número de las cadenas laterales de aminoácidos dadas en la unidad proteínica (1 = ácido aspártico, 2 = ácido glutámico, 3 = histidina, etc.);

[HA] es la proporción de la forma protonada del aminoácido al pH dado. $0 < [HA] < 1$.

[A] es la proporción de la forma desprotonada del aminoácido al pH dado. $0 < [A] < 1$.

50 Si se representa frente al pH, puede obtenerse el perfil de frecuencia de intercambio de protones (como el mostrado en la figura 3 para la papaína).

Etapla 2: Calcúlese la magnitud del desplazamiento de pH (denotada aquí como X) como sigue:

55
$$X = (A \times pI) + B$$

en la que A = -1,192 y B = 10,587 si se usa la composición total de aminoácidos;

y A = -0,931 y B = 8,430 si sólo se usan los aminoácidos accesibles en la superficie de la proteína.

60 Encuéntrese el mínimo de la función obtenida en la etapa 1 en el intervalo de pH 4-9. Añádase el valor de desplazamiento de pH calculado al mínimo para obtener el valor Y:

$$Y = P_{\text{mínimo}} + X$$

5 Léase el pH que corresponde al valor Y en la gráfica P vs. pH. Siempre habrá dos valores de pH que corresponden al valor Y en la gráfica P vs. pH (uno por debajo de $P_{\text{mínimo}}$ y uno por encima de $P_{\text{mínimo}}$). Es importante que el valor se lea por debajo del $P_{\text{mínimo}}$ (es decir, hacia los valores de pH inferiores). Éste es el pH óptimo estimado para la estabilidad de la enzima. La relación entre los parámetros X, Y y $P_{\text{mínimo}}$ se demuestra en la figura 7.

10 Los valores de A y B se calcularon basados en los resultados de una serie de experimentos que usan cuatro enzimas modelo (glucosa-oxidasa, catalasa, lactoperoxidasa y papaína). Estos valores se usaron posteriormente para predecir el pH óptimo para dos enzimas más (peroxidasa de rábano picante y glutamato-deshidrogenasa), y los experimentos mostraron que las predicciones tuvieron una precisión muy buena.

Etapa 3:

15 Una vez que se selecciona el pH óptimo, se eligen dos aditivos que contienen los siguientes grupos funcionales.

Grupo funcional 1:

20 El primer grupo funcional tiene un pK_a superior al pH óptimo para la estabilidad de la proteína (como se estima en las etapas 1 y 2), y está cargado positivamente en el pH óptimo. Esto significa que la carga del grupo cambia de neutra a positiva mientras acepta el protón.

25 El pK_a del grupo funcional debe ser de 1 a 5 unidades de pH superior al pH óptimo para la estabilidad de la proteína. Preferiblemente, debe estar dentro de 1-3 unidades de pH por encima del pH óptimo para la proteína.

Grupo funcional 2:

30 El segundo grupo funcional tiene un pK_a inferior al pH óptimo para la estabilidad de la proteína (como se estima en las etapas 1 y 2), y está cargado negativamente en el pH óptimo. Esto significa que la carga del grupo cambia de negativa a neutra mientras acepta el protón (por ejemplo, grupo carboxílico).

35 El pK_a del grupo funcional debe ser de 1 a 5 unidades de pH inferior al pH óptimo para la estabilidad de la proteína. Preferiblemente, debe estar dentro de 1-3 unidades de pH por debajo del pH óptimo para la proteína.

40 Los dos grupos funcionales pueden estar contenidos dentro de un compuesto (por ejemplo, un aminoácido). Preferiblemente, los dos grupos funcionales están localizados sobre los dos aditivos (por ejemplo, un aditivo contiene el primer grupo cargado negativamente, y el otro aditivo contiene el segundo grupo cargado positivamente). No hay un límite para el número de cada uno de los dos tipos de grupos funcionales añadidos a la formulación.

En algunos casos, puede ser beneficioso incorporar el grupo funcional cargado positivamente en exceso, con relación a la cantidad del grupo cargado negativamente.

45 La capacidad tamponante de los aditivos puede ser suficiente en los casos en los que su pK_a está sólo aproximadamente a 1 unidad de pH del pH óptimo. Si el pK_a está más alejado, su capacidad tamponante puede reducirse. Puede usarse entonces una pequeña concentración de tampón con un pK_a cercano al pH óptimo, para mantener el pH que se necesita.

50 Algunos ejemplos de clases de grupos para cada uno de los dos grupos funcionales que pueden incorporarse de manera útil como agentes estabilizantes, se muestran en la tabla 2.

Tabla 2

Grupo funcional 1	Grupo funcional 2
Grupo α -amino de aminoácidos	Grupo α -carboxílico de aminoácidos
Grupo amino de cadena lateral de aminoácidos	Grupo carboxílico de cadena lateral de aminoácidos
Purina (y compuestos basados en purina)	Grupo carboxílico de ácidos orgánicos tales como:
Aminas primarias tales como TRIS	Ácido láctico
Aminas secundarias	Ácido succínico
Aminas terciarias	
Aminas cuaternarias	Ácidos inorgánicos

Se da una lista de ejemplos específicos de posibles componentes de aditivos, con valores de pK_a , en la tabla 3.

Tabla 3

Aminoácidos	pK_a del grupo funcional 1	pK_a del grupo funcional 2
Glicina	9,8	2,4
Alanina	9,9	2,4
Valina	9,7	2,2
Leucina	9,7	2,3
Isoleucina	9,8	2,3
Serina	9,2	2,2
Treonina	9,1	2,1
Cisteína	10,8; 8,3	1,9
Metionina	9,3	2,1
Ácido aspártico	9,9	2,0; 3,7
Aspargina	8,8	2,1
Ácido glutámico	9,5	2,1; 4,1
Glutamina	9,1	2,2
Arginina	9,0	1,8
Lisina	9,2	2,2
Histidina	9,2; 6,0	1,8
Fenilalanina	9,2	2,2
Tirosina	9,1	2,2
Triptófano	9,4	2,4
Prolina	10,6	2,0
Ornitina	8,69	1,7
Citrulina	9,69	2,4
y diversos péptidos que consisten en los aminoácidos anteriores		
Otros ácidos carboxílicos		
Ácido fórmico		3,8
Ácido glioxílico		3,2
Ácido oxálico		1,3; 4,2
Ácido acético		4,8
Ácido glicólico		3,8
Ácido pirúvico		2,4
Ácido malónico		2,8; 5,7
Ácido láctico		3,8
Ácido glicérico		3,5
Ácido fumárico		3,0; 4,4
Ácido succínico		4,2; 5,6
Ácido málico		3,4; 5,1
Ácido α -tartárico		3,0; 4,3
Ácido glutárico		4,3; 5,4
Ácido ascórbico		4,1
Ácido adípico		4,4
Ácido gálico		4,4
Aminas		
Trimetilamina	9,8	
1,2-propanodiamina	6,66; 9,8	

1,3-propanodiamina	9,0; 10,3	
1,2,3-triaminopropano	9,5; 7,9	
Pentilamina	10,6	
Tris(hidroxiometil)aminometano	8,1	
Bencilamina	9,3	
Feniletilamina	9,8	
Tiramina	9,7	
Triptamina	10,2	
Hidroxitriptamina	9,8	
Iminas		
Etilenimina	8,01	
Otros compuestos		
Purina	8,96	
8-hidroxiuracilo	8,26	
Ión de amonio	9,25	
Quinolina	4,9	
1-isoquinolinamina	7,6	
1-metilimidazol	7,0	
Alantoína	8,9	
Barbital	7,4	
2-etilbencimidazol	6,2	
Brucina	8,3	
Uracilo	9,5	
2,4,6-trimetilpiridina	7,5	

5 Los materiales enumerados anteriormente se dan solamente con el fin de ilustración. Se comprenderá desde luego por una persona de habilidad normal en la técnica, que han de tenerse en cuenta aspectos específicos para proteínas particulares. Por ejemplo, es importante asegurar que los aditivos seleccionados no inhiban la actividad de la proteína. También es importante asegurar que los compuestos usados para mejorar la estabilidad térmica de las proteínas sean estables ellos mismos en las condiciones empleadas.

10 La invención puede combinarse con otras soluciones bien establecidas para la estabilidad de la proteína. Por ejemplo, puede incorporarse un inhibidor de proteasa en la formulación, para asegurar que la proteína no se digiera lentamente por la actividad de proteasa presente en la muestra.

15 Otro aditivo que puede usarse es un polialcohol, por ejemplo a una concentración de al menos 0,5%, y típicamente hasta 5% (p/p). Los ejemplos de tales compuestos son sacáridos tales como inositol, lactitol, manitol, xilitol y trehalosa.

20 La fuerza iónica de la formulación de proteína establecida mediante la aplicación de la presente invención puede ajustarse para cumplir el requisito para el uso que se pretende de la formulación (por ejemplo, formulación isotónica para uso terapéutico). De manera importante, los experimentos mostraron repetidamente que en principio la estabilidad de las proteínas a temperatura ambiente refleja la de una temperatura mayor, siendo la disminución de la velocidad de actividad muchos órdenes de magnitud más lenta a temperatura ambiente comparada con la de una temperatura aumentada (por ejemplo, 60°C).

Ejemplos

25 El ejemplo 5 siguiente ilustra la invención. Los ejemplos 1-4 y 6-12 se proporcionan como ejemplos de referencia.

Materiales

30 Sulfato de amonio (Fisher, código A/6480/60)
 BANA- hidrocloreto de N α -benzoil-DL-arginina- β -naftilamida (Sigma, código B4750) Catalasa (de hígado bovino, Sigma C9322, 2380 U/mg sólido)
 L-cisteína (Fluka, código 449808/1)
 Ácido cítrico (Fisher, código C/6200/53)
 35 Agua desionizada (conductividad < 10 μ S.cm⁻¹; de calidad analítica reactiva, Fisher o Sanyo Fiestream MultiPure)
 Hidrógeno ortofosfato disódico (Fisher, código S/4520/53)
 DMAC – 4-(dimetilamino)cinamaldehído (Sigma, código D4506)
 DMSO – dimetilsulfóxido (Sigma-Adrich código 154938-500)
 Sal disódica de EDTA (Fisher, código BPE120-500)
 40 Glucosa (Fisher, código G050061)

- 5
 10
 15
 20
- Glucosa-oxidasa (Biocatalysts G575P – 150 U/mg sólido)
 - Glutamato-deshidrogenasa de hígado bovino (BioChemika, código 49392)
 - Peroxidasa de rábano picante (Biocatalysts, código P558P)
 - Ácido clorhídrico (Fisher, código J/4310/17)
 - Peróxido de hidrógeno (Sigma H1009)
 - Ácido D,L-láctico (Fluka, código 1077141)
 - Lactoperoxidasa (de leche bovina, DMV International: 1.050 unidades.mg⁻¹ por el método de ABTS, pH 5,0)
 - Lisina (Sigma, código L5501)
 - Metanol (Fisher, código M/3950/17)
 - NADH – p-nicotinamida adenina dinucleótido en forma reducida, sal disódica (Sigma N-8129)
 - Ácido 2-oxoglutarico, sal disódica, deshidratado (Fluka, código 75892)
 - Papaína (700TU de Biocatalysts)
 - PBS – disolución salina tamponada con fosfato (Sigma D1408)
 - Yoduro potásico (Fisher, código 5880/53)
 - Hidróxido sódico (Fisher, código J/7800/15)
 - Dihidrógeno ortofosfato sódico (Fisher, código S/3760/60)
 - Almidón (Acros Organics, código 177132500)
 - TMB – tetrametilbencidina (Sigma T-2885)
 - Base TRIS – tris(hidroximetil)aminometano (Fisher Bioreagents, código BPE 152-1)

20 A menos que se indique de otra manera, los tampones de fosfato de concentraciones y pH dados (X mM, pH Y) usados en este trabajo, se prepararon mezclando hidrógeno ortofosfato disódico (X mM) con dihidrógeno ortofosfato sódico (X mM) para lograr el pH Y que se necesita.

25 A menos que se indique de otra manera, los tampones de citrato/fosfato de concentraciones y pH dados (X mM, pH Y) usados en este trabajo, se prepararon mezclando hidrógeno ortofosfato disódico (X mM) con ácido cítrico (X mM) para lograr el pH Y que se necesita.

30 **Plan experimental global**

En cada ejemplo, se preparó una disolución acuosa de una enzima dada con aditivos seleccionados en un tubo Eppendorf. A menos que se indique de otra manera, las concentraciones de enzimas usadas fueron como sigue:

35

Glucosa-oxidasa:	350 µg/ml
Catalasa:	100 µg/ml
Lactoperoxidasa:	100 µg/ml
Peroxidasa de rábano picante:	10 µg/ml
Glutamato-peroxidasa:	150 µg/ml
Papaína:	100 µg/ml

40 Cada disolución se analizó para determinar la actividad enzimática. Los tubos Eppendorf se sumergieron luego en el baño de agua (fijado a una temperatura elevada entre 55-65°C como se especifica en cada ejemplo) durante un periodo dado de tiempo. La disolución se analizó luego para determinar la actividad enzimática restante. Se usaron temperaturas por encima de la ambiente para ser más exigentes que trabajar a temperatura ambiente, y para proporcionar más rápidamente una indicación de la estabilidad de la proteína.

50 Los ejemplos pueden incluir información de la enzima particular, un procedimiento para seleccionar condiciones óptimas para la estabilidad (usando el algoritmo descrito anteriormente) basado en aminoácidos de superficie, y ejemplos prácticos que demuestran la estabilidad de la enzima a una temperatura elevada. Todas las secuencias de aminoácidos se obtuvieron del Protein Data Bank (<http://www.rcsb.org/pdb>) disponible públicamente.

Ejemplo 1 – Glucosa-oxidasa (de *Penicillium sp.*)

55 La glucosa-oxidasa (de *Penicillium sp.*) consiste en dos subunidades idénticas (M_r de cada una de aproximadamente 80.000). El punto isoeléctrico de la glucosa-oxidasa es de aproximadamente 4,3. La abundancia de los aminoácidos ácido-base en cada subunidad se muestra en la tabla 4.

Tabla 4

Aminoácido	Número total de cadenas laterales en la subunidad	Número de cadenas laterales expuestas en la superficie de la subunidad
Ácido aspártico (D)	36	23
Ácido glutámico (E)	23	17
Histidina (H)	8	3
Cisteína (C)	1 (3)*	0
Tirosina (Y)	19	6
Lisina (K)	27	21
Arginina (R)	17	11

* El primer número indica el número de cisteínas que no están acopladas en puentes disulfuro. El número entre paréntesis indica el número total de cisteínas en la subunidad.

El perfil de la frecuencia de intercambio de protones para la glucosa-oxidasa se muestra en la figura 8. El algoritmo de optimización del pH da los siguientes resultados para la glucosa-oxidasa:

$$P_{\text{mínimo}} = 0,17 \text{ (a pH 7,7)}$$

$$X = 4,33$$

$$Y = 4,50$$

$$\text{pH óptimo estimado} = 5,0$$

Se analizaron disoluciones de glucosa-oxidasa, tanto recién preparadas como después de incubación a temperatura elevada, para determinar la actividad de glucosa-oxidasa. Esto se llevó a cabo conforme al siguiente procedimiento:

Se añadieron 50 μl de la disolución a 50 ml de agua desionizada. Luego, se añadieron los siguientes reactivos:

- 10 ml de mezcla de reactivos (5,5 partes de dihidrógeno ortofosfato sódico 0,1 M, pH 6 + 4 partes de almidón al 2% p/p + 0,5 partes de 1mg/ml de enzima lactoperoxidasa);
- 5 ml de yoduro potásico 100 mM y
- 5 ml de disolución de glucosa al 20% p/p

Estos se mezclaron de manera conjunta rápidamente. Se contó el tiempo = 0 a partir de la adición de la glucosa. Después de 5 min, se añadió 1 ml de ácido clorhídrico acuoso 5 M para detener la reacción. Luego se leyó la absorbancia a 630 nm usando un espectrofotómetro de UV visible Unicam (tipo: Helios gamma). Si la intensidad del color era demasiado grande para permitir una lectura exacta, la muestra se diluyó con un volumen definido de agua desionizada para devolver el color a la escala. Los resultados se expresaron como tanto por ciento de recuperación, mediante referencia a la absorbancia medida en las muestras recién preparadas (es decir, antes de la incubación a temperatura elevada).

Ejemplo 1.1: Mala recuperación de la actividad tras incubación de glucosa-oxidasa fuera del pH óptimo calculado, en ausencia de aditivos beneficiosos

Se investigó el efecto de tampón de fosfato 50 mM ($\text{pK}_a = 7,2$) sobre la estabilidad de la glucosa-oxidasa a 60°C, en el intervalo de pH de 6,0 a 8,0. Se preparó el tampón de fosfato mezclando hidrógeno ortofosfato disódico (50 mM) y dihidrógeno ortofosfato sódico (50 mM), para lograr el pH que se necesita. No hubo actividad medible después de la incubación de glucosa-oxidasa a 60°C durante 15 minutos, en presencia de fosfato a pH 7,0, 7,5 o 8,5. Algo de actividad fue medible a los 15 minutos a pH 6,5 y 6,0, pero cayó hasta 0 en 60 minutos. Se observó una mejor recuperación de la actividad de glucosa-oxidasa en agua desionizada. Sin embargo, incluso en este caso la actividad cayó hasta cero después de 180 minutos. El pH de la disolución de glucosa-oxidasa en agua desionizada fue de aproximadamente 6. Éste es el resultado de la actividad tamponante de la propia enzima y de las impurezas en la preparación de la enzima. La recuperación de la actividad fue mala porque el pH estaba fuera del pH óptimo calculado, y la formulación no contenía los aditivos beneficiosos.

Ejemplo 1.2: Mala recuperación de la actividad tras incubación de glucosa-oxidasa fuera del pH óptimo calculado, en presencia de aditivos beneficiosos

Se investigó el efecto de tampón TRIS 50 mM ($\text{pK}_a = 8,3$), en presencia de ácido láctico, sobre la estabilidad de la glucosa-oxidasa a 60°C, en el intervalo de pH de 7,5 a 9,0. Se preparó el tampón TRIS mezclando base TRIS (50 mM) y ácido láctico (50 mM), para lograr el pH que se necesita. No hubo actividad medible después de la incubación de glucosa-oxidasa a 60°C durante 15 minutos, en presencia de TRIS/lactato a pH 7,0, 7,5, 8,0, 8,5 o 9,0. La recuperación de la actividad fue mala a pesar de la presencia de aditivos beneficiosos. Esto es debido a que el pH estaba lejos del pH óptimo calculado.

Ejemplo 1.3: Buena recuperación de la actividad tras incubación de glucosa-oxidasa cerca del pH óptimo calculado, pero en ausencia de aditivos beneficiosos

5 Se investigó el efecto de tampón de citrato 50 mM ($pK_{a1} = 3,2$, $pK_{a2} = 4,8$, $pK_{a3} = 6,4$) sobre la estabilidad de la glucosa-oxidasa a 60°C, en el intervalo de pH de 4,4 a 5,4. Se preparó el tampón de citrato mezclando ácido cítrico (50 mM) con hidróxido sódico (5 M), para lograr el pH que se necesita. La disminución de la actividad de la enzima fue la más lenta a pH 4,8. Sobre 15% de la actividad original fue todavía medible después de 22 h de incubación a 60°C. La disminución de la actividad de la enzima fue solamente ligeramente inferior usando las mismas formulaciones a pH 4,6 y 5,0. Sin embargo, usando la misma formulación con pH ajustado a $> 0,4$ unidades de distancia del óptimo dio como resultado una disminución considerablemente más rápida de la actividad de la enzima.

Ejemplo 1.4: Muy buena recuperación de la actividad tras incubación de glucosa-oxidasa cerca del pH óptimo calculado, en presencia de aditivos beneficiosos

15 La incorporación de glutamato e histidina en la formulación de glucosa-oxidasa ajustada a un pH cercano al óptimo dio como resultado la mejor conservación de la actividad de glucosa-oxidasa tras incubación a 60°C. Se preparó la disolución de fondo mezclando ácido glutámico (50 mM) e histidina (50 mM), y ajustando el pH al valor que se necesita usando o ácido clorhídrico (5 M) o hidróxido sódico. Sobre 50% de la actividad original fue todavía medible después de 22 h de incubación a 60°C. La formulación contenía un grupo protonable cargado positivamente con un pK_a por encima del pH óptimo (es decir, grupo amino de los dos aminoácidos – pK_a aproximadamente 9) y un grupo protonable cargado negativamente con un pK_a por debajo del pH óptimo (es decir, grupos carboxílicos de los dos aminoácidos – pK_a entre 1,8-4,1).

Ejemplo 2 – Catalasa (de hígado bovino)

25 La catalasa (de hígado bovino) consiste en cuatro subunidades idénticas (M_r de cada una de aproximadamente 65.000). El punto isoeléctrico de la catalasa es de aproximadamente 5,7. La abundancia de los aminoácidos ácido-base en cada subunidad se muestra en la tabla 5.

30

Tabla 5

Aminoácido	Número total de cadenas laterales en la subunidad	Número de cadenas laterales expuestas en la superficie de la subunidad
Ácido aspártico (D)	39	19
Ácido glutámico (E)	25	17
Histidina (H)	21	14
Cisteína (C)	4	0
Tirosina (Y)	20	7
Lisina (K)	27	17
Arginina (R)	31	21

El perfil de la frecuencia de intercambio de protones para la catalasa se muestra en la figura 9. El algoritmo de optimización del pH da los siguientes resultados para la catalasa:

35

$P_{\text{mínimo}} = 0,37$ (a pH 8,0)
 $X = 3,12$
 $Y = 3,49$
 pH óptimo estimado = 6,6

40

Se analizaron disoluciones de catalasa, tanto recién preparadas como después de incubación a temperatura elevada, para determinar la actividad de catalasa. Esto se llevó a cabo conforme al siguiente procedimiento:

45

Se añadieron 2 ml de peróxido de hidrógeno (30 mM en agua) a 18 ml de PBS en un recipiente de polipropileno de 125 ml. Se añadieron 100 μ l de la muestra de catalasa, y se mezclaron. La mezcla resultante se incubó a temperatura ambiente precisamente durante 30 min. Mientras tanto, se mezclaron los siguientes reactivos en una cubeta de plástico para tomar mediciones espectrofotométricas:

50

- 2,73 ml de tampón de citrato/fosfato (0,1 M, pH 5,0);
- 100 μ l de TMB (3 mg/ml, disueltos en DMSO);
- 100 μ l de lactoperoxidasa

Después de 30 minutos de un periodo de incubación, se añadieron a la cubeta 70 μ l de la mezcla que contenía catalasa, y se leyó la absorbancia en aproximadamente 30 s. Los resultados se expresaron como tanto por ciento de

recuperación, mediante referencia a la absorbancia medida en las muestras recién preparadas (es decir, antes de la incubación a temperatura elevada).

5 Ejemplo 2.1: Mala recuperación de la actividad tras incubación de catalasa fuera del pH óptimo calculado, tanto en presencia como en ausencia de aditivos beneficiosos

10 Se investigó el efecto de tampón de citrato 50 mM ($pK_{a1} = 4,8$, $pK_{a2} = 6,4$) y de tampón TRIS sobre la estabilidad de la catalasa a 55°C, fuera del pH óptimo estimado para la catalasa. Se preparó tampón de citrato mezclando ácido cítrico (50 mM) con hidróxido sódico (5 M), para lograr el pH que se necesita. Se preparó tampón TRIS mezclando base TRIS (50 mM) con ácido clorhídrico (5 M), para lograr el pH que se necesita. No hubo virtualmente actividad medible después de la incubación de catalasa a 55°C durante 60 minutos, en presencia de tampón de citrato a pH 4,5 o en presencia de tampón TRIS a pH 8,2. La recuperación de la actividad fue mala porque el pH estaba fuera del pH óptimo calculado (a pesar de la presencia del “aditivo beneficioso” en el caso de TRIS).

15 Ejemplo 2.2: Buena recuperación de la actividad tras incubación de catalasa cerca del pH óptimo calculado, pero en ausencia de aditivos beneficiosos

20 Se investigó el efecto de tampón de citrato 50 mM ($pK_{a1} = 4,8$, $pK_{a2} = 6,4$) sobre la estabilidad de la glucosa-oxidasa a 60°C, en el intervalo de pH de 5,2 a 7,2. Se preparó el tampón de citrato mezclando ácido cítrico (50 mM) con hidróxido sódico (5 M), para lograr el pH que se necesita. La disminución de la actividad de la enzima fue la más lenta a pH 6,4. Sobre 20% de la actividad original fue todavía medible después de 22 h de incubación a 55°C. La disminución de la actividad de la enzima fue solamente ligeramente más rápida usando las mismas formulaciones a pH 6,8 y 6,0. Sin embargo, usando la misma formulación con pH ajustado a $> 0,4$ unidades de distancia del óptimo dio como resultado una disminución considerablemente más rápida de la actividad de la enzima.

25 Ejemplo 2.3: Muy buena recuperación de la actividad tras incubación de catalasa cerca del pH óptimo calculado, en presencia de aditivos beneficiosos

30 La incorporación de histidina (50 mM) en la formulación de catalasa ajustada a un pH cercano al óptimo dio como resultado la mejor conservación de la actividad de glucosa-oxidasa tras incubación a 55°C. Sobre 40% de la actividad original fue todavía medible después de 22 h de incubación a 55°C. La formulación contenía un grupo protonable cargado positivamente con un pK_a por encima del pH óptimo (es decir, grupo amino de histidina – pK_a aproximadamente 9) y un grupo protonable cargado negativamente con un pK_a por debajo del pH óptimo (es decir, grupos carboxílicos de histidina – pK_a aproximadamente 2). La cadena lateral de histidina (pK_a aproximadamente 6) ofreció una capacidad tamponante útil para mantener el pH en el valor que se necesita.

35 Ejemplo 3 – Papaína

40 La papaína consiste en una unidad (M_r 21.000). El punto isoeléctrico de la papaína es de aproximadamente 8,7. La papaína es una proteasa, y si se activa es capaz de autodigestión. Para evitar la autodigestión, ha de mantenerse en forma inactiva (oxidada). Todos los experimentos que implican papaína presentados en la presente invención se llevaron a cabo usando la forma inactiva (oxidada) de la papaína.

45 La abundancia de los aminoácidos ácido-base en cada subunidad se muestra en la tabla 6.

Tabla 6

Aminoácido	Número total de cadenas laterales en la subunidad	Número de cadenas laterales expuestas en la superficie de la subunidad
Ácido aspártico (D)	6	3
Ácido glutámico (E)	10	7
Histidina (H)	2	0
Cisteína (C)	7	4
Tirosina (Y)	19	10
Lisina (K)	10	8
Arginina (R)	12	11

50 El perfil de la frecuencia de intercambio de protones para la papaína se muestra en la figura 10. El algoritmo de optimización del pH da los siguientes resultados para la papaína:

- $P_{\text{mínimo}} = 0,54$ (a pH 6,3)
- $X = 0,33$
- $Y = 0,87$
- pH óptimo estimado = 5,8

55

Se analizaron disoluciones de papaína, tanto recién preparadas como después de incubación a temperatura elevada, para determinar la actividad de papaína. Esto se llevó a cabo conforme al siguiente procedimiento:

5 Se mezclaron 100 μ l de la muestra de papaína con 100 μ l de cisteína (24 mg/ml preparados en tampón de fosfato 25 mM, pH 6,9). Se añadieron 160 μ l de EDTA (2,5 mM preparado en tampón de fosfato 250 mM, pH 6,0), y la mezcla resultante se incubó a 60°C durante 10 min. Se añadieron 160 μ l de BANA (5 mg/ml preparados en DMSO al 20%/agua al 80%) y se incubaron a 60°C durante 10 min más. La reacción se detuvo mediante la adición de 280 μ l de una mezcla HCl/metanol (preparada mezclando 1 ml de HCl 5 M y 9 ml de metanol). Se añadieron 400 μ l de DMAC, y la mezcla final se dejó a temperatura ambiente durante 10
10 25 min. Luego se midió la absorbancia de la mezcla a 540 nm. Si la intensidad del color era demasiado grande para permitir una lectura exacta, la muestra se diluyó con un volumen definido de metanol al 80% (v/v) (preparado mezclando 4 partes en volumen de metanol y 1 parte en volumen de agua desionizada) para devolver el color a la escala. Los resultados se expresaron como tanto por ciento de recuperación, mediante referencia a la absorbancia medida en las muestras recién preparadas (es decir, antes de la
15 incubación a temperatura elevada).

Ejemplo 3.1: Mala recuperación de la actividad tras incubación de papaína fuera del pH óptimo calculado, en ausencia de aditivos beneficiosos

20 Se investigó el efecto de tampón de citrato 50 mM ($pK_{a1} = 4,8$, $pK_{a2} = 6,4$) y de tampón TRIS sobre la estabilidad de la papaína a 65°C, a un pH fuera del pH óptimo estimado para la papaína. Se preparó tampón de citrato mezclando ácido cítrico (50 mM) con hidróxido sódico (5 M), para lograr el pH que se necesita. Se preparó tampón TRIS mezclando base TRIS (50 mM) con ácido clorhídrico (5 M), para lograr el pH que se necesita. La actividad de la papaína disminuyó hasta aproximadamente 20% en 4 horas, y casi a cero en 22 horas de incubación a 65°C. La
25 recuperación de la actividad fue mala porque el pH estaba fuera del pH óptimo calculado (a pesar de la presencia del “aditivo beneficioso” en el caso de TRIS).

Ejemplo 3.2: Recuperación de la actividad satisfactoria tras incubación de papaína cerca del pH óptimo calculado, en presencia de aditivos beneficiosos

30 La incorporación de glutamato e histidina en la formulación de papaína ajustada a un pH cercano al óptimo dio como resultado una conservación satisfactoria de la actividad de papaína tras incubación a 65°C. Se preparó la disolución de fondo mezclando ácido glutámico (50 mM) e histidina (50 mM) para lograr el pH que se necesita. Sobre 65% de la actividad original fue todavía medible después de 22 h de incubación a 65°C si el pH se había ajustado a 5,7. La
35 disminución de la actividad de la enzima fue solamente ligeramente más rápida usando las mismas formulaciones a pH 5,4 y 6,1. Sin embargo, usando la misma formulación con pH ajustado a $> 0,3$ unidades de distancia del óptimo dio como resultado una disminución considerablemente más rápida de la actividad de la enzima. La formulación contenía un grupo protonable cargado positivamente con un pK_a por encima del pH óptimo (es decir, grupo amino de los dos aminoácidos – pK_a aproximadamente 9) y un grupo protonable cargado negativamente con un pK_a por
40 debajo del pH óptimo (es decir, grupos carboxílicos de los dos aminoácidos – pK_a aproximadamente 2). La cadena lateral de la histidina (pK_a aproximadamente 6) ofreció una capacidad tamponante útil para mantener el pH en el valor que se necesita.

Ejemplo 4 – Glutamato-deshidrogenasa (de hígado bovino)

45 La glutamato-deshidrogenasa (de hígado bovino) consiste en seis subunidades (M_r de cada una aproximadamente 56.000). El punto isoelectrico de la glutamato-deshidrogenasa es de aproximadamente 5,5. La abundancia de los aminoácidos ácido-base en cada subunidad se muestra en la tabla 7.

50

Tabla 7

Aminoácido	Número total de cadenas laterales en la subunidad	Número de cadenas laterales expuestas en la superficie de la subunidad
Ácido aspártico (D)	29	22
Ácido glutámico (E)	31	27
Histidina (H)	13	7
Cisteína (C)	6	0
Tirosina (Y)	18	6
Lisina (K)	30	25
Arginina (R)	30	20

El perfil de la frecuencia de intercambio de protones para la glutamato-deshidrogenasa se muestra en la figura 11. El algoritmo de optimización del pH da los siguientes resultados para la glutamato-deshidrogenasa:

55

$$P_{\text{mínimo}} = 0,32 \text{ (a pH 7,9)}$$

$$X = 3,21$$

Y = 3,53
pH óptimo estimado = 6,2

5 Se analizaron disoluciones de glutamato-deshidrogenasa, tanto recién preparadas como después de incubación a temperatura elevada, para determinar la actividad de glutamato-deshidrogenasa. Esto se llevó a cabo conforme al siguiente procedimiento:

10 Se añadieron 100 μ l de la muestra de glutamato-deshidrogenasa a una cubeta que contenía la mezcla de los siguientes reactivos:

- 2,5 ml de tampón de fosfato (0,2 M, pH 7,4) que contienen EDTA (350 μ M)
- 200 μ l de ácido 2-oxoglutarico (200 mM);
- 100 μ l de sulfato de amonio (1 M)
- 100 μ l de NADH (7 mM)

15 Éstos se mezclaron de manera conjunta rápidamente. Se contó el tiempo = 0 a partir de la adición de glutamato-deshidrogenasa. Precisamente después de 5 min, se leyó la absorbancia a 340 nm. Los resultados se expresaron como tanto por ciento de recuperación, mediante referencia a la absorbancia medida en las muestras antes de su incubación a temperatura elevada.

20 Ejemplo 4.1: Mala recuperación de la actividad tras incubación de glutamato-deshidrogenasa fuera del pH óptimo calculado, en ausencia de aditivos beneficiosos

25 Se investigó el efecto de tampón de citrato 50 mM ($pK_{a1} = 4,8$, $pK_{a2} = 6,4$) y de tampón TRIS sobre la estabilidad de la glutamato-deshidrogenasa a 55°C, a un pH fuera del pH óptimo estimado para la glutamato-deshidrogenasa. Se preparó tampón de citrato mezclando ácido cítrico (50 mM) con hidróxido sódico (5 M), para lograr el pH que se necesita. Se preparó tampón TRIS mezclando base TRIS (50 mM) con ácido clorhídrico (5 M), para lograr el pH que se necesita. La actividad de la enzima disminuyó hasta aproximadamente 15% (en el caso del tampón TRIS, pH 8,0) y hasta casi cero (en el caso del tampón citrato (pH 4,0) después de 4 horas de incubación a 55°C. La actividad cayó hasta cero en tampón TRIS después de 22 horas de incubación a la temperatura elevada. La recuperación de la actividad fue mala porque el pH estaba fuera del pH óptimo calculado (a pesar de la presencia del “aditivo beneficioso” en el caso de TRIS).

35 Ejemplo 4.2: Recuperación de la actividad satisfactoria tras incubación de glutamato-deshidrogenasa cerca del pH óptimo calculado, en presencia de aditivos beneficiosos

40 La incorporación de lisina (50 mM) en la formulación de glutamato-deshidrogenasa ajustada a un pH cercano al óptimo dio como resultado una conservación satisfactoria de la actividad de la enzima tras incubación a 55°C. Se preparó la disolución de fondo mezclando 9 partes de lisina (55 mM) con 1 parte de hidrógeno ortofosfato disódico (50 mM). El pH se ajustó al valor que se necesita con ácido cítrico (1 M). Sobre 75% de la actividad original fue todavía medible después de 22 h de incubación a 55°C si el pH se había ajustado a 6,1. La disminución de la actividad de la enzima fue solamente ligeramente más rápida usando las mismas formulaciones a pH 5,8 y 6,4. Sin embargo, usando la misma formulación con pH ajustado a $> 0,3$ unidades de distancia del óptimo dio como resultado una disminución considerablemente más rápida de la actividad de la enzima. La formulación contenía un grupo protonable cargado positivamente con un pK_a por encima del pH óptimo (es decir, grupo amino de la lisina – pK_a aproximadamente 9) y un grupo protonable cargado negativamente con un pK_a por debajo del pH óptimo (es decir, grupos carboxílicos de la lisina – pK_a aproximadamente 3). Se usó tampón de citrato-fosfato 10 mM para mantener el pH.

50 Ejemplo 5 – Peroxidasa de rábano picante

55 La peroxidasa de rábano picante consiste en una unidad (M_r de aproximadamente 42.000). El valor comúnmente establecido para el punto isoeléctrico de la isoforma más abundante de peroxidasa en la raíz de rábano picante es de aproximadamente 8,6. La abundancia de los aminoácidos ácido-base en la unidad de peroxidasa de rábano picante se muestra en la tabla 8.

Tabla 8

Aminoácido	Número total de cadenas laterales en la subunidad	Número de cadenas laterales expuestas en la superficie de la subunidad
Ácido aspártico (D)	21	9
Ácido glutámico (E)	7	5
Histidina (H)	3	1
Cisteína (C)	0 (8)*	0
Tirosina (Y)	5	2
Lisina (K)	6	4
Arginina (R)	20	16

* El primer número indica el número de cisteínas que no están acopladas en puentes disulfuro. El número entre paréntesis indica el número total de cisteínas en la subunidad.

5 El perfil de la frecuencia de intercambio de protones para la peroxidasa de rábano picante se muestra en la figura 5. El algoritmo de optimización del pH da los siguientes resultados para la peroxidasa de rábano picante:

$$P_{\text{mínimo}} = 0,08 \text{ (a pH } 8,1)$$

$$X = 0,42$$

$$Y = 0,49$$

$$\text{pH óptimo estimado} = 7,1$$

10 Se analizaron disoluciones de peroxidasa de rábano picante, tanto recién preparadas como después de incubación a temperatura elevada, para determinar la actividad de peroxidasa de rábano picante. Esto se llevó a cabo conforme al siguiente procedimiento:

15 Se añadieron 10 μl de la muestra de peroxidasa de rábano picante a una cubeta que contenía la mezcla de los siguientes reactivos:

- 2,5 ml de tampón de citrato/fosfato (0,05 M, pH 5,0)
- 100 μl de peróxido de hidrógeno (2 mM);
- 100 μl de TMB (3 mg/ml, disueltos en DMSO)

20 Éstos se mezclaron de manera conjunta rápidamente. Se contó el tiempo = 0 a partir de la adición de la muestra de peroxidasa de rábano picante. Precisamente después de 3 min, se leyó la absorbancia a 630 nm. Los resultados se expresaron como tanto por ciento de recuperación, mediante referencia a la absorbancia medida en las muestras antes de su incubación a temperatura elevada.

25 Ejemplo 5.1: Mala recuperación de la actividad tras incubación de peroxidasa de rábano picante fuera del pH óptimo calculado, en ausencia de aditivos beneficiosos

30 Se investigó el efecto de tampón 50 mM de citrato/fosfato (pH = 5,0) y de tampón de fosfato (pH = 6,0) sobre la estabilidad de la peroxidasa de rábano picante a 65°C, a un pH fuera del pH óptimo estimado para la peroxidasa de rábano picante. Se preparó el tampón de citrato/fosfato mezclando ácido cítrico (50 mM) con hidrógeno ortofosfato disódico (50 mM), para lograr la concentración que se necesita. El tampón de fosfato se preparó mezclando hidrógeno ortofosfato disódico (50 mM) y dihidrógeno ortofosfato sódico (50 mM), para lograr el pH que se necesita. La actividad de la enzima cayó hasta < 10% en el caso del tampón de citrato/fosfato (pH 5,0) y hasta aproximadamente 30% en el caso del tampón de fosfato (pH 6,0), después de 22 horas de incubación a 65°C. La recuperación de la actividad fue mala porque el pH estaba fuera del pH óptimo calculado. Tampoco hubo un grupo funcional protonable cargado positivamente.

40 Ejemplo 5.2: Recuperación de la actividad satisfactoria tras incubación de peroxidasa de rábano picante cerca del pH óptimo calculado, en presencia de aditivos beneficiosos

45 La incorporación de lisina y lactato en la formulación de peroxidasa de rábano picante ajustada a un pH cercano al óptimo dio como resultado una conservación satisfactoria de la actividad de la enzima tras incubación a 65°C. Se preparó la disolución de fondo mezclando lisina (50 mM) con lactato (50 mM), para lograr el pH que se necesita. Casi 75% de la actividad original fue todavía medible después de 22 h de incubación a 65°C si el pH se había ajustado a 7,2 o 7,5. La disminución de la actividad de la enzima fue solamente ligeramente más rápida usando las mismas formulaciones entre pH 6,9 y 8,1. Esto hace de la peroxidasa de rábano picante (junto con la lactoperoxidasa como se muestra en el ejemplo 6) una enzima con el pH óptimo más amplio comparado con otras enzimas estudiadas. Esto podría explicarse por el hecho que el pH óptimo para la enzima está localizado en un

50 mínimo relativamente amplio en la gráfica de frecuencia de intercambio de protones (véase la figura 5).

Ejemplo 6 - Lactoperoxidasa

El punto isoeléctrico de la lactoperoxidasa citado en la bibliografía es 8,0-9,2. Si puede asumirse que hay una semejanza estructural entre la peroxidasa de rábano picante y la lactoperoxidasa (como el valor similar de los puntos isoeléctricos puede indicar), entonces el pH óptimo estimado para la lactoperoxidasa debería de ser similar al de la peroxidasa de rábano picante.

Se analizaron disoluciones de lactoperoxidasa, tanto recién preparadas como después de incubación a temperatura elevada, para determinar la actividad de lactoperoxidasa. Esto se llevó a cabo conforme al siguiente procedimiento:

Se mezclaron 100 µl de la muestra de lactoperoxidasa con 10 ml de agua desionizada. Se añadieron 1,25 ml de la mezcla resultante a una cubeta que contenía la mezcla de los siguientes reactivos:

- 1,25 ml de tampón de citrato/fosfato (0,1 M, pH 5,0)
- 100 µl de peróxido de hidrógeno (2 mM);
- 100 µl de TMB (3 mg/ml, disueltos en DMSO)

Éstos se mezclaron de manera conjunta rápidamente. Se contó el tiempo = 0 a partir de la adición de la muestra de lactoperoxidasa. Precisamente después de 5 min, se leyó la absorbancia a 630 nm. Los resultados se expresaron como tanto por ciento de recuperación, mediante referencia a la absorbancia medida en las muestras antes de su incubación a temperatura elevada.

Ejemplo 6.1: Mala recuperación de la actividad tras incubación de lactoperoxidasa fuera del pH óptimo calculado, en ausencia de aditivos beneficiosos

Se investigó el efecto de tampón 50 mM de citrato/fosfato (pH = 5,0) y de tampón de fosfato (pH = 6,0) sobre la estabilidad de la lactoperoxidasa a 65°C, a un pH fuera del pH óptimo estimado para la lactoperoxidasa (calculado a partir de la secuencia de la peroxidasa de rábano picante). Se preparó el tampón de citrato/fosfato mezclando ácido cítrico (50 mM) con hidrógeno ortofosfato disódico (50 mM), para lograr la concentración que se necesita. El tampón de fosfato se preparó mezclando hidrógeno ortofosfato disódico (50 mM) y dihidrógeno ortofosfato sódico (50 mM), para lograr el pH que se necesita. La actividad de la enzima cayó hasta casi 0 en el caso del tampón de citrato/fosfato (pH 5,0) y hasta aproximadamente 10% en el caso del tampón de fosfato (pH 6,0), después de 4 horas de incubación a 65°C. La recuperación de la actividad fue mala porque el pH estaba fuera del pH óptimo calculado. Tampoco hubo un grupo funcional protonable cargado positivamente.

Ejemplo 6.2: Recuperación de la actividad satisfactoria tras incubación de lactoperoxidasa cerca del pH óptimo calculado, en presencia de aditivos beneficiosos

La incorporación de TRIS en la formulación de lactoperoxidasa ajustada a un pH cercano al óptimo (como se ha calculado a partir de la secuencia de la peroxidasa de rábano picante) dio como resultado una conservación satisfactoria de la actividad de la enzima tras incubación a 65°C. Se preparó la disolución de fondo mezclando base TRIS (50 mM) con ácido clorhídrico (5 M), para lograr el pH que se necesita. 100% de la actividad original fue todavía medible después de 4 h de incubación a 65°C si el pH se había ajustado a 7,8 o 8,2. Hubo sólo una pequeña disminución de la actividad de la enzima usando las mismas formulaciones a pH 7,4 y 8,6.

Ejemplo 7 – Urato-oxidasa

Se analizaron disoluciones de urato-oxidasa (típicamente de 250 µg/ml), tanto recién preparadas como después de incubación a temperatura elevada, para determinar la actividad de urato-oxidasa. Esto se llevó a cabo conforme al siguiente procedimiento:

Se mezclaron las siguientes disoluciones en una cubeta de 1 cm:

- 1,5 ml de tampón de borato (25 mM, pH 8,5); preparado ajustando el pH de ácido bórico 25 mM usando hidróxido sódico;
- 0,8 ml de urato sódico (2 mM);

Se añadieron 40 µl de muestra de urato-oxidasa (máx. 250 µg/ml de una preparación de 5,3 U/mg) y se mezclaron rápidamente. Se contó el tiempo = 0 a partir de la adición de la urato-oxidasa. Después de 5 min, se añadieron los siguientes reactivos en este orden particular (el primer reactivo debe añadirse a los 5 minutos exactamente, el tiempo de adición de los otros reactivos es menos fundamental):

- 0,8 ml de tampón de citrato/fosfato (0,5 M, pH 4,0); preparado mezclando ácido cítrico 0,5 M con hidrógeno fosfato disódico 0,5 M para lograr el pH que se necesita;
- 100 µl de TMB (3 mg/ml, disueltos en DMSO);
- 100 µl de lactoperoxidasa (1 mg/ml, disueltos en agua)

5 La disolución resultante se mezcló muy bien y se leyó la absorbancia a 630 nm usando un espectrofotómetro de UV-visible Unicam (tipo: Helios gamma). Los resultados se expresaron como tanto por ciento de recuperación, por referencia a la absorbancia medida en las muestras recién preparadas (es decir, antes de la incubación a temperatura elevada).

10 La actividad de la urato-oxidasa disminuyó muy rápidamente tras incubación a 60°C en las disoluciones de referencia (tampón de fosfato, pH 7,0; tampón de TRIS/HCl, pH 7,2). Se logró una recuperación considerablemente mejor en tampón de borato (pH 9,0). Sin embargo, la mejor estabilidad se observó si se cumplieron todas las condiciones de la teoría de estabilización de la proteína (es decir, si los grupos ionizables cargados tanto positiva como negativamente estaban presentes en el pH óptimo). Esto se demuestra en la figura 12 para la mezcla de purina y succinato y TRIS y serina.

Ejemplo 8 – Vacuna recombinada antihepatitis B

20 Se determinó la actividad antigénica *in vitro* de la vacuna antihepatitis B usando el kit de diagnóstico monoclonal AUSZYME (Abbott Laboratories; nº cat. 1980-64). La actividad antigénica se determinó tanto en la vacuna completa como en el sobrenadante después de centrifugación (13.000 rpm, 5 min). Cada muestra se midió por triplicado. La actividad antigénica se expresó como tanto por ciento con respecto al valor medido en la vacuna refrigerada sin tratar, como sigue:

$$25 \quad R = \frac{(S - N)}{(C - N)} \times 100$$

$$30 \quad S = \frac{S1 + S2 + S3}{3}$$

$$35 \quad C = \frac{C1 + C2 + C3}{3}$$

40 en las que:

R es la recuperación de la actividad antigénica (%)

N es el valor de la medida con AUSZYME del control negativo

C1, C2 y C3 son los valores de tres medidas repetidas con AUSZYME de la muestra de referencia (es decir, vacuna refrigerada sin tratar)

45 S1, S2 y S3 son los valores de tres medidas repetidas con AUSZYME de la muestra ensayada.

La actividad antigénica restante de la vacuna antihepatitis B se ensayó después de incubación a 55°C durante 2, 4 y 7 semanas. Las formulaciones estabilizantes que consistían en histidina y anión fosfato y ajustadas al pH óptimo retuvieron > 95% de la actividad antigénica original después de 7 semanas. Por contraste, la actividad antigénica restante de la formulación de vacuna original (tampón de fosfato 18 mM, pH 6,9-7,1, que contenía cloruro sólido 132 mM) fue < 10% en este punto. Las formulaciones estabilizantes no parecieron afectar la asociación alúmina-antígeno, ya que la actividad antigénica determinada en el sobrenadante de la formulación estabilizante después de centrifugación fue comparable con la medida en el sobrenadante de la muestra original. Se cree que la presencia del anión fosfato asegura una unión óptima de la vacuna sobre la alúmina.

55

Ejemplo 9 – Efecto de los polialcoholes

Se demostró un efecto beneficioso de una selección de polialcoholes sobre la estabilidad de la glucosa-oxidasa a 60°C, en presencia de los excipientes optimizados para intercambio de protones, a un pH optimizado. Usando la mezcla optimizada de histidina (25 mM) y lactato (25 mM) a pH 5,3 como fondo, la recuperación de la actividad de glucosa-oxidasa después de 20 horas de incubación a 60°C fue mejor en presencia de inositol, lactitol, manitol, xilitol y trehalosa (todos a 10%) que en ausencia de estos polialcoholes.

60

Se observó un efecto similar sobre la estabilidad de la glucosa-oxidasa con otro polialcohol, el glicerol. El efecto del glicerol se estudió a diversas concentraciones, y se encontró que el efecto fue más pronunciado a concentraciones entre 10% y 20% (p/p). Sin embargo, incluso la presencia de glicerol a una concentración de 1,33% dio como resultado en una mejora medible de la estabilidad de la glucosa-oxidasa, sobre la lograda en la mezcla optimizada de histidina/lactato (pH 5,3).

De manera importante, se encontró que la presencia de polialcoholes no tenía un efecto beneficioso significativo si la disolución de fondo estaba lejos de las condiciones óptimas, por lo que se refiere a la presencia de excipientes para el intercambio de protones y el pH. De este modo, por ejemplo, si se usó tampón de fosfato (50 mM, pH 7,0) como disolución de fondo, entonces la incubación de glucosa-oxidasa a 60°C durante 20 horas dio como resultado una pérdida completa de actividad de glucosa-oxidasa tanto en presencia como en ausencia de los polialcoholes seleccionados.

Ejemplo 10 – Glucosa-oxidasa adsorbida sobre partículas de alúmina

Se absorbió glucosa-oxidasa sobre partículas de alúmina mediante incubación de alúmina en una disolución de glucosa-oxidasa (25 µg/ml) a 4°C durante la noche. La actividad de la glucosa-oxidasa adsorbida, tanto recién preparada como después de incubación a 40°C, se analizó conforme al siguiente procedimiento:

Las siguientes disoluciones se mezclaron en una cubeta de 1 cm:

- 2,0 ml de tampón de citrato/fosfato (50 M, pH 5,0); preparado mezclando ácido cítrico (50 mM) con hidrógeno ortofosfato disódico (50 mM) para lograr el pH que se necesita;
- Glucosa al 40% (p/p) en agua desionizada
- 100 µl de lactoperoxidasa (1 mg/ml) en agua desionizada;
- 100 µl de TMB (3 mg/ml, disueltos en DMSO)

Se añadieron 10 µl de muestra de glucosa-oxidasa y se mezclaron rápidamente. Se contó el tiempo = 0 a partir de la adición de la muestra. La absorbancia se leyó a 630 nm, exactamente 5 min después de la adición de la muestra, usando un espectrofotómetro de UV-visible Unicam (tipo: Helios gamma). Los resultados se expresaron como tanto por ciento de recuperación, por referencia a la absorbancia medida en las muestras recién preparadas (es decir, antes de la incubación a temperatura elevada).

La formulación optimizada que se encontró previamente para estabilizar la glucosa-oxidasa en disolución (histidina + glutamato, total de 50 mM, pH 5,0), también se encontró que era eficaz en la conservación de la actividad de glucosa-oxidasa cuando se adsorbía sobre partículas de alúmina. A diferencia de en las disoluciones acuosas, la eficacia de la formulación dependía de la concentración de los excipientes. De este modo, la formulación que contenía el total de excipientes 50 mM dio como resultado una mejor recuperación de la actividad que la que contenía el total de excipientes 10 mM. La recuperación fue considerablemente mejor que la observada en agua desionizada o tampón de fosfato (50 mM, pH 7,0).

Ejemplo 11 – Efecto de los polialcoholes

Se demostró un efecto beneficioso de una selección de polialcoholes sobre la estabilidad de la catalasa a 55°C, en presencia de los excipientes optimizados para el intercambio de protones, a un pH optimizado. Usando la mezcla optimizada de histidina (50 mM) y lactato (50 mM) a pH 6,6 como fondo, la recuperación de la actividad de glucosa-oxidasa después de 24 horas de incubación a 55°C fue mejor en presencia de inositol, lactitol, manitol, xilitol y trehalosa (todos a 10%) que en ausencia de estos polialcoholes.

Ejemplo 12

Se llevó a cabo un análisis de HPLC como sigue: la fase móvil A consistió en TFA (ácido trifluoroacético) al 0,1% en agua, la fase móvil B consistió en TFA al 0,1% en acetonitrilo. Las fases móviles se filtraron antes de su uso. Se empleó un gradiente lineal: A/B (70:30) a A/B (68:32) en 20 min. El cromatógrafo de líquidos (Agilent 1100 series) estaba equipado con un detector de 214 nm y una columna de 4,6 x 250 mm (Zorbax Eclipse XDB-C18) 00G-4167-E0 rellena con gel de sílice de octadecilsililo, con una granulometría de 5 µm, mantenida a 30°C. El caudal se mantuvo a 1 ml/min. Se inyectaron 15 µl de muestras acuosas de insulina humana (típicamente de 1-2,5 mg/ml).

La recuperación de la integridad estructural de la insulina humana se estudió en un ensayo de almacenamiento acelerado tras incubación a 65°C durante 5 horas. Aunque el área del pico cromatográfico principal cayó hasta

aproximadamente 50% en la disolución de referencia (tampón de fosfato, 50 mM, pH 7,0), más de 90% de la insulina se recuperó en la disolución en la formulación estabilizada que comprendía glutamato (25 mM) y lisina (25 mM) a pH 5,3.

5 Ejemplo 13

10 Se llevó a cabo un análisis de HPLC como sigue: la fase móvil se preparó mezclando 71 partes (en volumen) de una disolución de TRIS (0,05 M, en agua ajustada con ácido clorhídrico a un pH de 7,5) y 29 partes (en volumen) de alcohol n-propílico. La fase móvil se filtró antes de su uso. El cromatógrafo de líquidos (Agilent 1100 series) estaba equipado con un detector de 214 nm y una columna de 4,6 x 250 mm (Phenomenex 00G-4167-E0) rellena con gel de sílice de butilsililo, con una granulometría de 5 µm y una porosidad de 30 nm, mantenida a 45°C. El caudal se mantuvo a 0,5 ml/min. Se inyectaron 15 µl de muestras acuosas de hormona del crecimiento humana (típicamente de 1-2,5 mg/ml).

15 La recuperación de la integridad estructural de la hormona del crecimiento humana se estudió en un ensayo de almacenamiento acelerado tras incubación a 40°C durante 4 semanas. Aunque el área del pico cromatográfico principal cayó hasta < 35% en las disoluciones de referencia (es decir, tampón de fosfato, 50 mM, pH 7,0 o en agua), más de 70% de la hormona del crecimiento humana se recuperó en la disolución en las formulaciones estabilizadas que comprendían glutamato (10 mM, pH 6,0) o lisina (10 mM, pH 6,0).

20

REIVINDICACIONES

- 5 1.- Un método para método para aumentar la estabilidad de una proteína en un sistema acuoso, que comprende:
- (a) seleccionar un pH para la composición que está dentro de un intervalo de estabilidad de la proteína que es al menos 50% de la estabilidad máxima de la proteína con respecto al pH; y
- (b) preparar una composición que comprende la proteína y dos agentes estabilizantes, caracterizada porque:
- 10 (i) los dos agentes estabilizantes tienen grupos ionizables capaces de intercambiar protones con la proteína y con los productos ionizados de la disociación del agua;
- (ii) los grupos ionizables consisten en primeros grupos que están cargados positivamente cuando están protonados y sin carga cuando están desprotonados, y segundos grupos que están sin carga cuando están protonados y cargados negativamente cuando están desprotonados, en los que los primeros y segundos grupos tienen valores de pK_a , respectivamente, de 1 a 5 unidades de pH superiores y de 1 a 5 unidades inferiores al pH de la composición;
- 15 y
- 20 (iii) el pH de la composición está dentro de un intervalo de estabilidad de la proteína que es al menos 50% de la estabilidad máxima de la proteína con respecto al pH.
- 2.- Un método para aumentar la estabilidad de una proteína en un sistema acuoso, que comprende:
- 25 (a) seleccionar un pH para la composición que está dentro de un intervalo de $\pm 0,5$ unidades de pH del pH al que la composición tiene una estabilidad máxima con respecto al pH; y
- (b) preparar una composición que comprende la proteína y dos agentes estabilizantes, caracterizada porque:
- (i) los dos agentes estabilizantes tienen grupos ionizables capaces de intercambiar protones con la proteína y con los productos ionizados de la disociación del agua;
- 30 (ii) los grupos ionizables consisten en primeros grupos que están cargados positivamente cuando están protonados y sin carga cuando están desprotonados, y segundos grupos que están sin carga cuando están protonados y cargados negativamente cuando están desprotonados, en los que los primeros y segundos grupos tienen valores de pK_a , respectivamente, de 1 a 5 unidades de pH superiores y de 1 a 5 unidades inferiores al pH de la composición;
- 35 y
- (iii) el pH de la composición está dentro de un intervalo de $\pm 0,5$ unidades de pH del pH al que la composición tiene una estabilidad máxima con respecto al pH.
- 40 3.- Un método conforme a la reivindicación 1, en el que dicho intervalo es al menos 60% de la estabilidad máxima.
- 4.- Un método conforme a la reivindicación 1, en el que dicho intervalo es al menos 70% de la estabilidad máxima.
- 45 5.- Un método conforme a la reivindicación 1, en el que dicho intervalo es al menos 80% de la estabilidad máxima.
- 6.- Un método conforme a una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que los valores de pK_a respectivos están cada uno dentro de 1 a 4 unidades de pH del pH de la composición.
- 50 7.- Un método conforme a cualquier reivindicación precedente, en el que al menos 80% del primer y segundo grupos ionizables están ionizados.
- 55 8.- Un método conforme a la reivindicación 7, en el que el primer y segundo grupos ionizables están de manera sustancial completamente ionizados.

- 9.- Un método conforme a la reivindicación 7 o reivindicación 8, en el que los valores de pK_a respectivos están cada uno dentro de 1 a 3 unidades de pH del pH de la composición.
- 5 10.- Un método conforme a cualquier reivindicación precedente, en el que el pH de la composición es de 4 a 9.
11.- Un método conforme a cualquier reivindicación precedente, en el que la composición comprende adicionalmente un polialcohol.
- 10 12.- Un método conforme a la reivindicación 11, en el que la composición comprende al menos 0,5% (p/p) del polialcohol.
13.- Un método conforme a cualquier reivindicación precedente, en el que la composición comprende al menos 0,1% (p/p) de los dos agentes estabilizantes.
- 15 14.- Un método conforme a la reivindicación 13, en el que la composición comprende al menos 0,5% (p/p) de los dos agentes estabilizantes.
15.- Un método conforme a cualquier reivindicación precedente, en el que la composición comprende hasta 200 mM de cada agente estabilizante.
- 20 16.- Un método conforme a cualquier reivindicación precedente, en el que la composición comprende hasta 100 mM de cada agente estabilizante.
17.- Un método conforme a cualquier reivindicación precedente, en el que la proteína está en estado natural.
- 25 18.- Un método conforme a cualquier reivindicación precedente, en el que la estabilidad de la proteína se determina en términos de su retención de sus características funcionales y/o estructurales.
19.- Un método conforme a cualquier reivindicación precedente, en el que la proteína es una hormona o factor de crecimiento.
- 30 20.- Un método conforme a cualquier reivindicación precedente, en el que la proteína es una proteína terapéutica.
21.- Un método conforme a cualquier reivindicación precedente, en el que la proteína es un anticuerpo terapéutico.
- 35 22.- Un método conforme a cualquier reivindicación precedente, en el que la proteína es un interferón.
23.- Un método conforme a cualquier reivindicación precedente, en el que la proteína es inmunógena.
- 40 24.- Un método conforme a cualquier reivindicación precedente, en el sistema acuoso es una disolución, suspensión o dispersión acuosa.
25.- El método conforme a una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 24, en el que un agente estabilizante contiene los primeros grupos ionizables y el otro agente estabilizante contiene los segundos grupos ionizables.
- 45 26.- El método conforme a una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 24, en el que un agente estabilizante contiene tanto los primeros grupos ionizables como los segundos grupos ionizables.
27.- Un método conforme a cualquier reivindicación precedente, en el que el primer grupo ionizable es un grupo de amina.
- 50 28.- Un método conforme a la reivindicación 27, en el que un agente estabilizante es TRIS.
29.- Un método conforme a cualquier reivindicación precedente, en el que el segundo grupo ionizable es un grupo carboxílico.
- 55 30.- Un método conforme a la reivindicación 29, en el que un agente estabilizante es un ácido carboxílico distinto a un aminoácido.
- 60

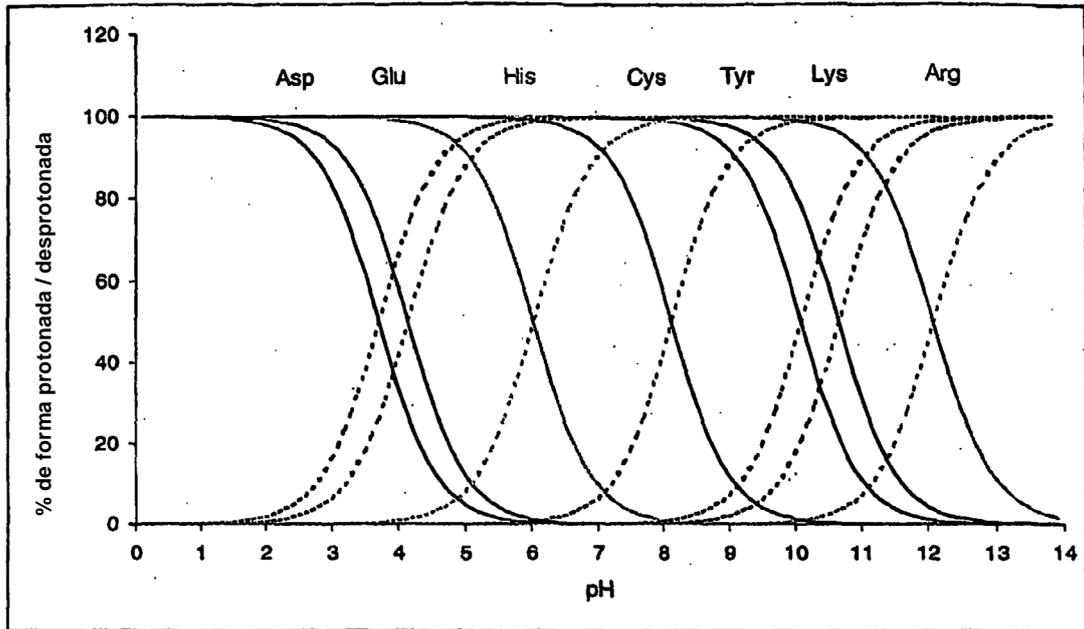


Fig. 1.

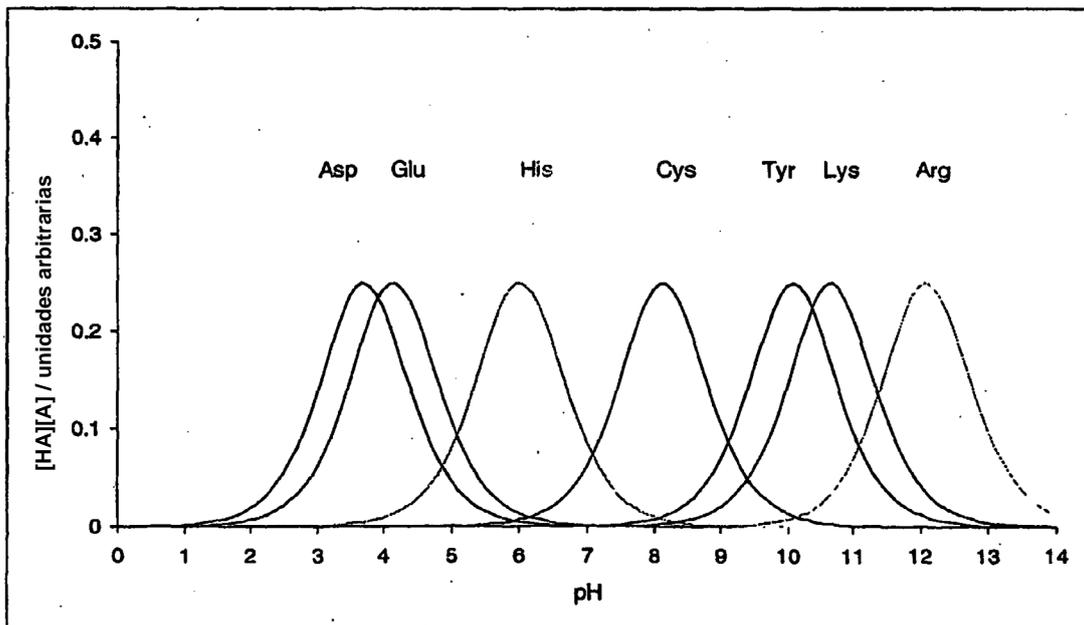


Fig. 2.

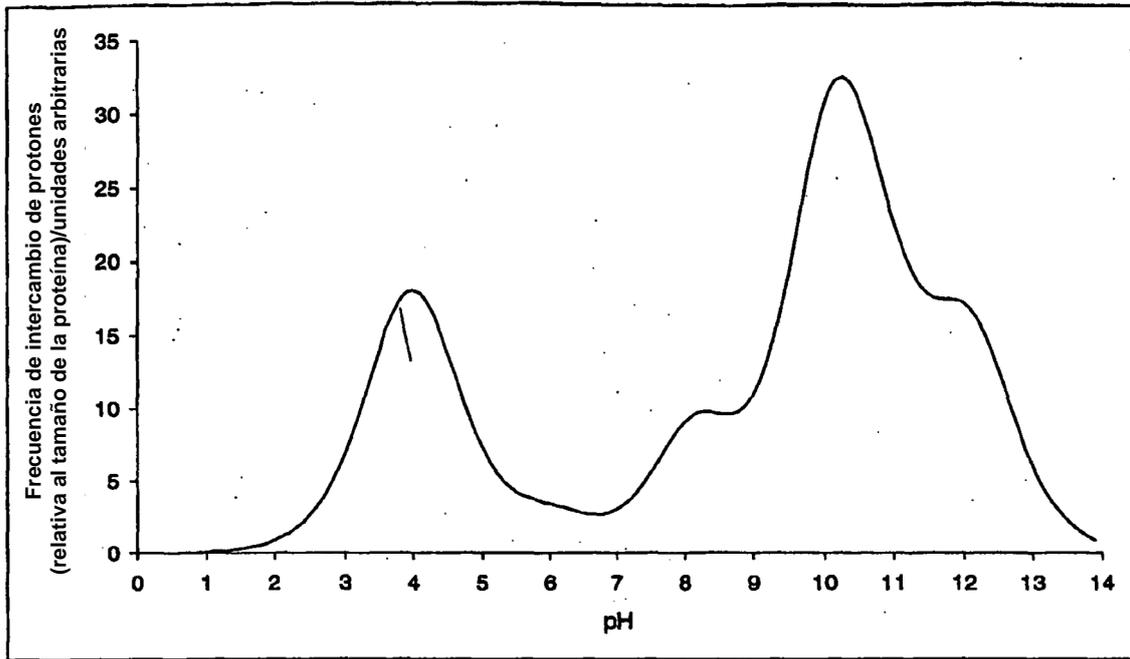


Fig. 3.

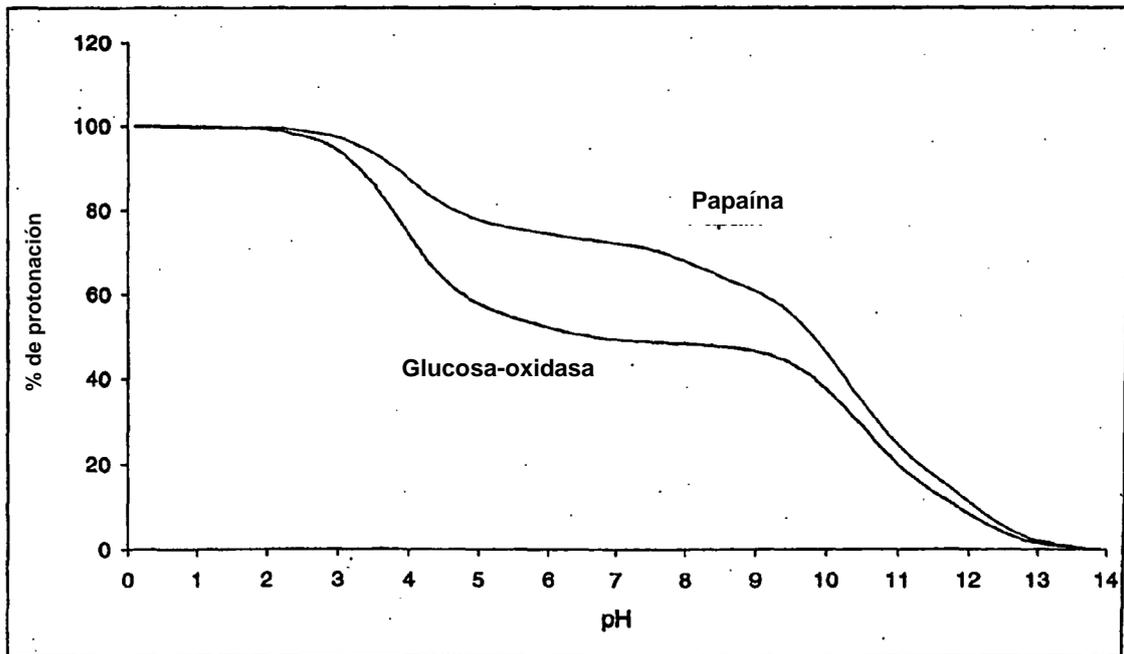


Fig. 4.

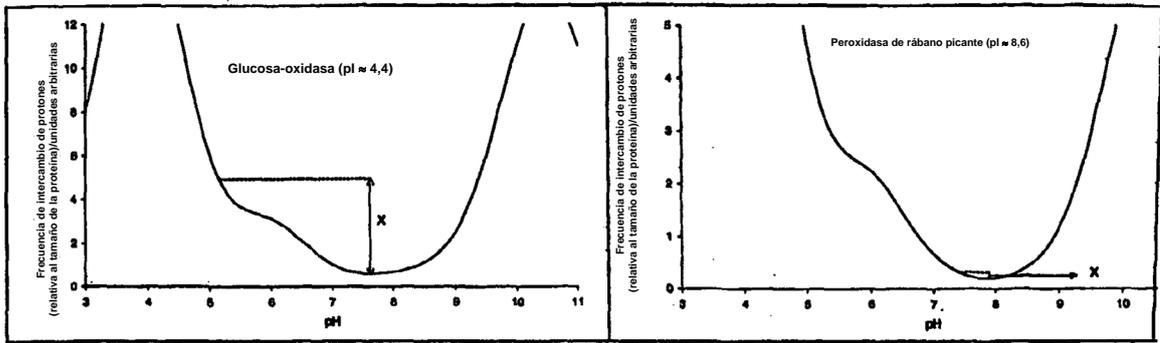


Fig. 5.

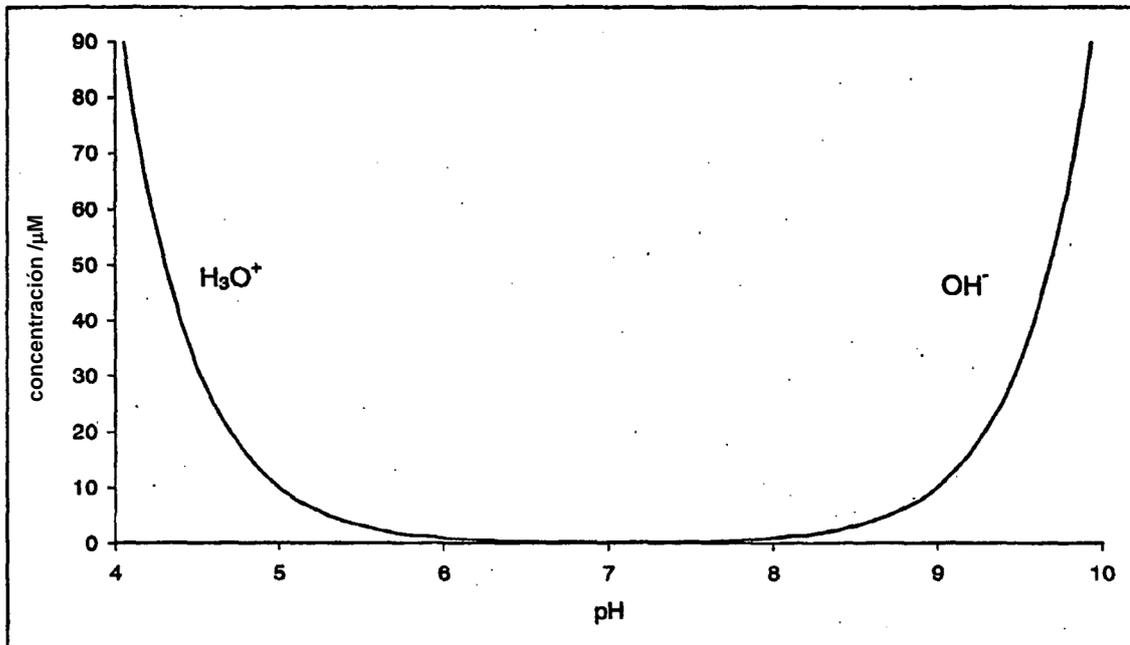


Fig. 6

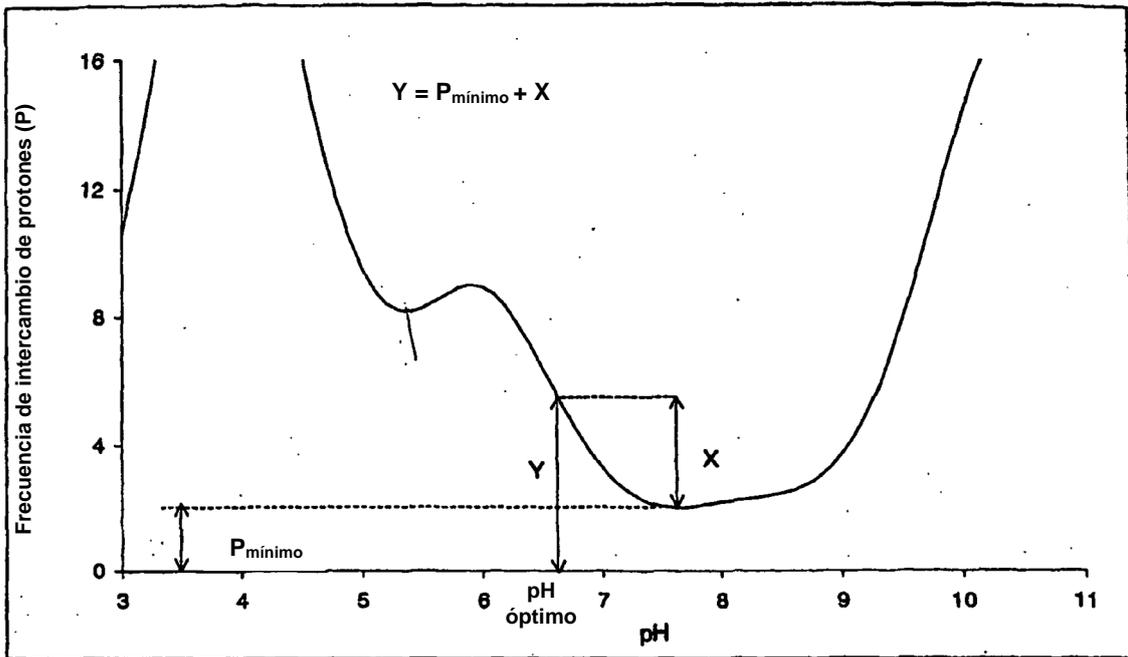


Fig. 7.

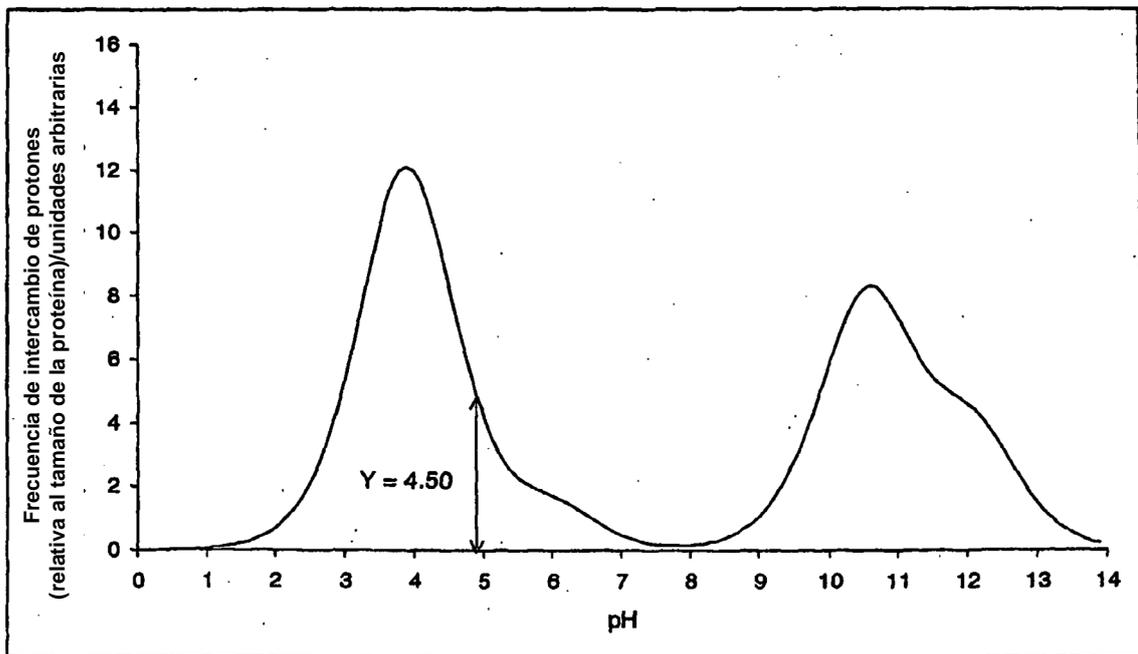


Fig. 8.

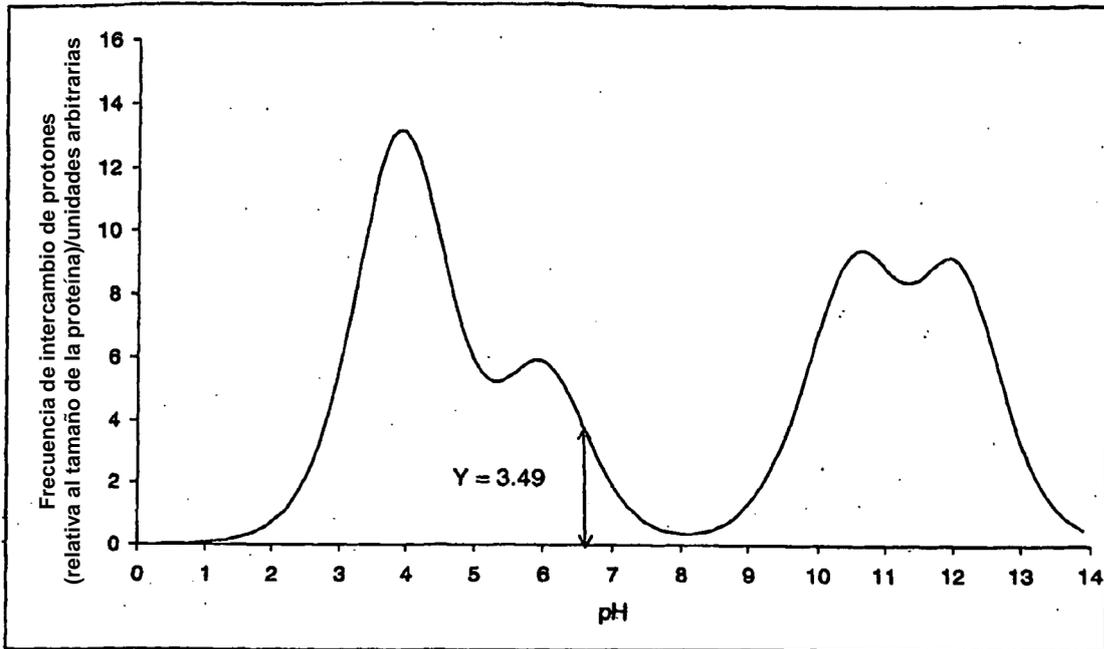


Fig. 9

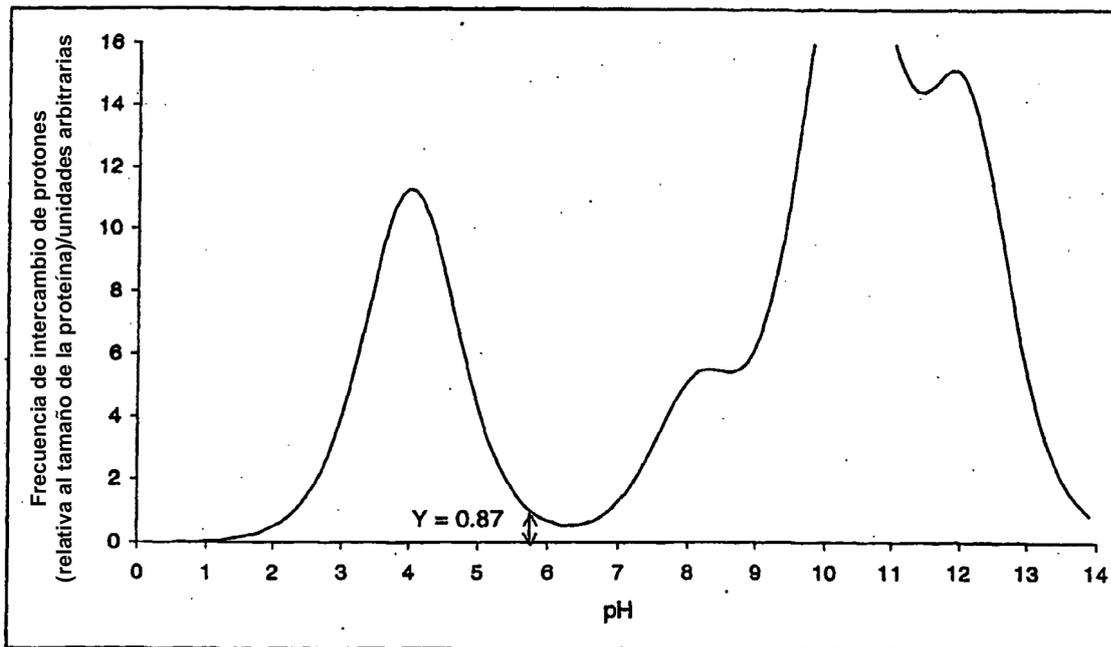


Fig. 10.

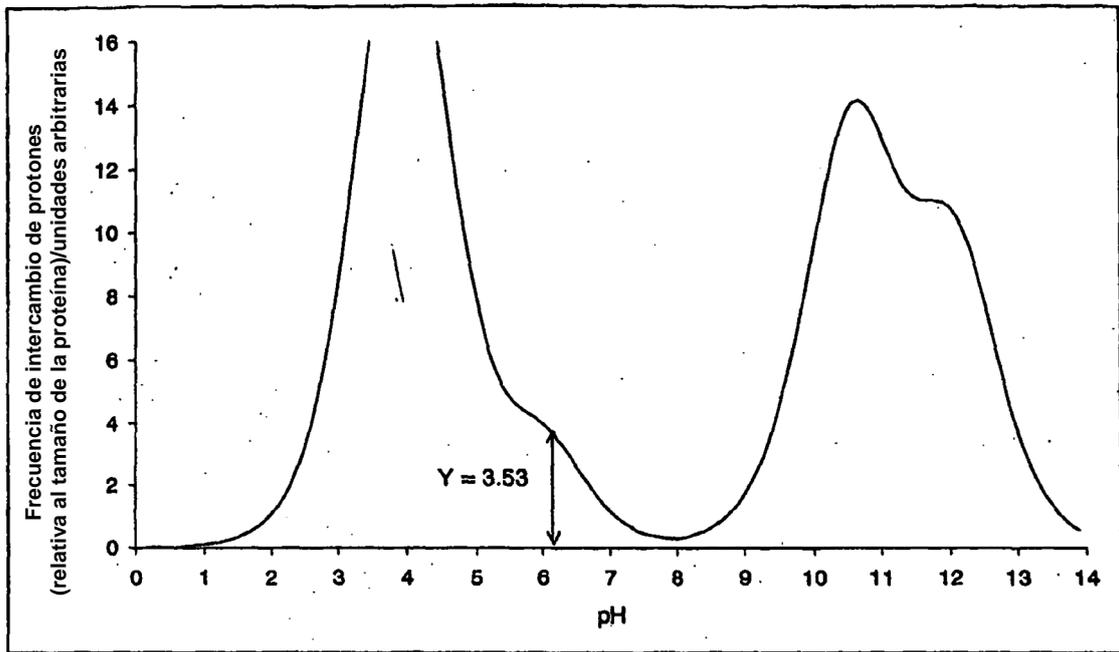


Fig. 11.

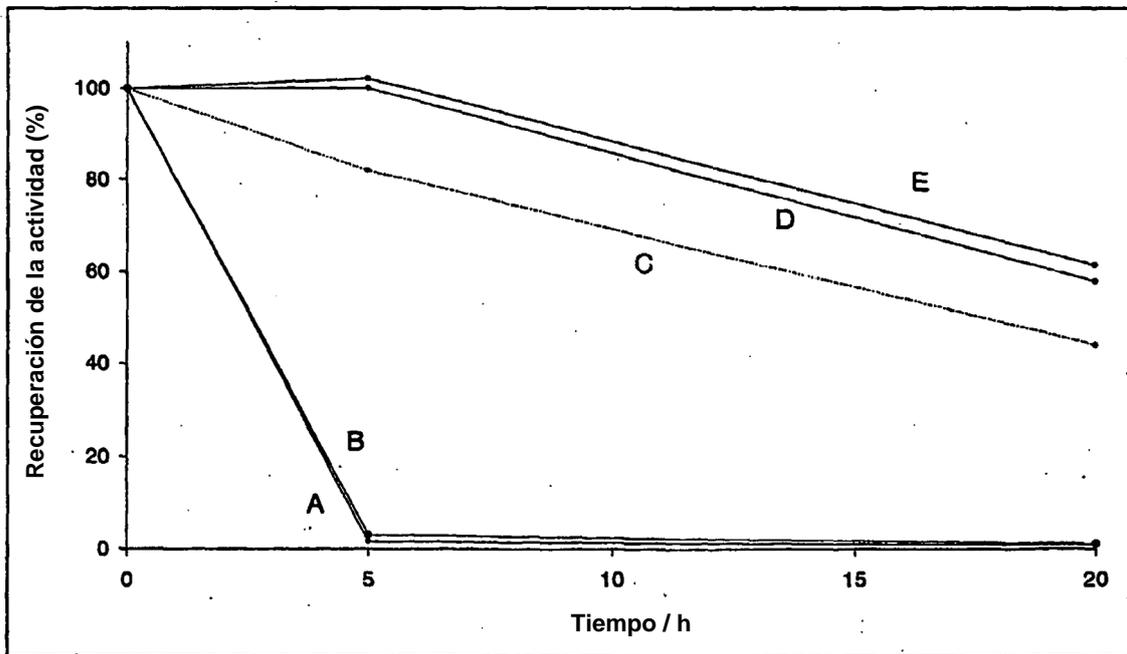


Fig. 12.